

**IDENTIFIZIERUNG SPEZIFISCHER PROTEINMUSTER IM
URIN IN KORRELATION ZUR REJEKTION NACH
NIERENTRANSPLANTATION**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Stephanie Finke

geboren am 26.04.1989 in Hoyerswerda

Gutachter:

1. **Prof. Dr. med. Kerstin Junker, Homburg**
2. **Prof. Dr. med. Gunter Wolf, Jena**
3. **Prof. Dr. med. Markus Giessing, Düsseldorf**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 22.05.2014

Abkürzungsverzeichnis

2D-PAGE	2-dimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese
AAG	Alpha-1-Acid Glycoprotein
APC	antigenpräsentierende Zellen
ATN	akute Transplantatnephropathie
AUC	Area under the curve
CAD	chronische Transplantatabstoßung (Chronic Allograft Dysfunction)
CMV	Cytomegalie-Virus
CDC	Lymphozytentoxizitätstest
dest.	Aqua dest. (destiliertes Wasser)
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
DTT	Dithiothreitol
DMF	Dimethylformamid
EAM	energieabsorbierende Matrix
EAU	European Association of Urology
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assays
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPCL	protonenfreies Wasser
IEF	isoelektrische Fokussierung
IL-8	Interleukin 8
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMF	Mycophenolatmofetil
MPA	Mycophenolsäure
n.a.	nicht verfügbare Daten (not available)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTX	Nierentransplantation
PCR	Polymerasekettenreaktion

PMF	Peptide Mass Fingerprinting
PTM	posttranslationale Modifikationen
SELDI-TOF-MS	Surface-enhanced Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass spectrometry
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulphate)
TFA	Trifluoressigsäure
V.a.	Verdacht auf

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Zusammenfassung.....	7
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 Indikationen für eine Nierentransplantation.....	12
1.2 Abstoßungsreaktion.....	13
1.2.1 Einteilung der Abstoßungsreaktionen.....	14
1.2.2 Immunologischer Ablauf der Rejektion.....	15
1.2.2.1 Das HLA-System	16
1.2.2.2 Die akute Rejektion	17
1.3 Derzeitiges postoperatives Vorgehen bei Verdacht auf eine Abstoßungsreaktion.....	18
1.3.1 Immunsuppression.....	18
1.3.2 Klinische Diagnostik.....	19
1.4 Möglichkeiten der Proteomik zur Identifizierung neuer Biomarker	21
2 ZIELE DER ARBEIT.....	24
3 METHODIK.....	26
3.1 Untersuchungsmaterialien.....	26
3.1.1 Patientengut.....	26
3.1.2 Materialien.....	28
3.2 Methoden.....	28
3.2.1 SELDI-TOF-MS und bioinformatische Auswertung.....	28
3.2.1.1 Vorbereiten der ProteinChip®-Arrays Q10 und CM10.....	29
3.2.1.2 Aufnahme von Urinproteinspektren mittels ProteinChip®-System PCS 4000.....	30
3.2.1.3 Bioinformatische Auswertung der aufgenommenen Proteinspektren	31
3.2.2 Darstellung des Urinproteinprofils mittels 2D-Gelelektrophorese.....	32
3.2.2.1 Proteinfällung nach Wessel/Flügge	32
3.2.2.2 Rehydrierung.....	33
3.2.2.3 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension).....	33
3.2.2.4 SDS-PAGE (2. Dimension).....	34
3.2.2.5 Fixieren, Färben und Entfärben.....	34
3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay.....	35
3.2.4 Multiplex-2D-Gelelektrophorese.....	36
3.2.4.1 Fällung der Urinproteine mit 75% Acetonitril.....	37
3.2.4.2 Markierung mit G-Dyes (NHDyagnostics).....	37
3.2.4.3 Rehydrierung.....	38
3.2.4.4 Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung.....	39
3.2.4.5 Equilibrierung.....	40
3.2.4.6 Zweite Dimension – SDS-PAGE.....	41
3.2.4.7 Scannen der Gele.....	41
3.2.4.8 Auswertung mit Software Delta 2D 4.2	42
3.2.4.9 Färben des Gels mit Coomassie Brilliant Blau G 250 und anschließendes Picken der Proteinspots	43
3.2.5 Tryptischer Verdau ausgewählter Proteinspots.....	43
3.2.5.1 Durchführung des Tryptischen Verdaus.....	43
3.2.6 Peptid Mass Fingerprinting (MALDI-TOF-MS und Datenbank-Analyse)	44
3.2.6.1 Durchführung.....	44
3.2.6.2 Vermessung im Bruker Daltonics Ultraflex Massenspektrometer.....	45
3.2.6.3 Datenbankanalyse mit MASCOT.....	45
3.2.7 Western Blot.....	45
3.2.7.1 Durchführung.....	46
3.2.8 Quantitative Analyse eines Kandidatenproteins mittels ELISA	46
3.2.8.1 Durchführung.....	47
3.2.8.2 statistische Auswertung mittels SPSS 19.0.....	48
4 ERGEBNISSE	50

4.1 Identifizierung spezifischer Proteinmuster im Urin von Patienten mit und ohne Rejektion.....	50
4.1.1 Ermittlung von Proteinspektren der Urine mittels SELDI-TOF-MS.....	50
4.1.2 Clusteranalyse und bioinformatische Ermittlung der Vorhersagegenauigkeit mit Hilfe der Software XL-Miner 3.5.....	51
4.1.3 Überprüfen der Anwendbarkeit des Vorhersagemodells an einem unabhängigen Testset.....	54
4.1.4 Ermittlung der Vorhersagegenauigkeit anhand eines Testsets bestehend aus postoperativen Urinproben.....	55
4.1.5 Ermittlung eines spezifischen Expressionsmusters im Urin für postoperativ entnommene Proben.....	58
4.1.6 Ermittlung eines spezifischen Proteinmusters zur Unterscheidung der Rejektionsart.....	60
4.1.6.1 Unterscheidung von vaskulärer und interstitieller Rejektion.....	61
4.1.6.2 Unterscheidung von Patientenproben mit interstitieller Rejektion und ohne Rejektion.....	61
4.1.6.3 Unterscheidung von Patientenproben mit vaskulärer Rejektion und ohne Rejektion.....	62
4.2 2D-PAGE.....	62
4.3 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Urin nach Bradford.....	63
4.4 Proteinidentifizierung mit Hilfe der Multiplex-2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS.....	65
4.4.1 Auswertung mit Delta2D 4.2.....	65
4.4.2 In-Gel-Verdau mit Trypsin und anschließende MALDI-TOF-MS.....	69
4.5 Western Blot.....	74
4.6 Quantifizierung des Kandidatenproteins Alpha-1-Antitrypsin mittels ELISA.....	75
4.7 Statistische Datenauswertung.....	76
4.7.1 Auswertung der Konzentrationsbestimmung aus ELISA und Bradford	76
4.7.2 Ermittlung eines Cut-Off-Wertes für das Verhältnis von [AAT]:[Gesamtprotein].....	78
4.7.3 Überprüfung einer möglichen Einflussnahme von anderen klinischen Faktoren	80
5 DISKUSSION.....	83
5.1 Urine und Serum als Analysematerial.....	83
5.2 Ermittlung eines spezifischen Proteinmusters im Urin mittels SELDI-TOF-MS zur Vorhersage einer Rejektion nach Nierentransplantation.....	84
5.3 Vergleich des Proteinmusters im Urin mittels Multiplex-2D-Gelelektrophorese und Identifizierung von Kandidatenproteinen mittels PMF.....	88
5.4 Validierung und statistische Auswertung des Kandidatenproteins Alpha-1-Antitrypsin.....	92
5.5 Die Kandidatenproteine Alpha-1-Antitrypsin, Haptoglobin und Transferrin.....	94
6 SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	97
Literaturverzeichnis.....	99
Anhang.....	105

Zusammenfassung

Die Nierentransplantation ist eine wichtige Therapiemöglichkeit für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Vor allem unmittelbar nach der Transplantation ist die Gefahr einer akuten Abstoßungsreaktion besonders hoch. Eine frühe Diagnose ermöglicht einen schnellen Therapiebeginn und sichert Organfunktion und -überleben. Die derzeitigen klinischen Parameter zur Verlaufskontrolle sind jedoch nicht für eine frühzeitige Erkennung geeignet. Der Goldstandard ist aktuell die Nierenbiopsie, ein invasives Verfahren, bei dem jedoch häufig bereits Schädigungen am Organ festzustellen sind.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Proteinmuster im Urin identifiziert werden können, die eine Vorhersage der akuten Abstoßung des Transplantats ermöglichen. In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnten bereits spezifische Proteinprofile im

Urin definieren werden, die mit einer Rejektion zum Zeitpunkt der bioptischen Sicherung korrelieren. In der aktuellen Untersuchung, im Rahmen dieser Promotionsarbeit, wurde basierend auf den ermittelten Proteinsignaturen überprüft, ob bereits wenige Tage nach der Transplantation eine Rejektion erkennbar ist. Zudem sollten Kandidatenproteine aus dieser Signatur identifiziert und validiert werden.

Für die Untersuchungen wurden mit der SELDI-TOF-MS Technologie unter Verwendung von ProteinChip® Q10- und CM10-Arrays 78 Urinproben analysiert, welche am 1. – 10. postoperativen Tag gewonnen wurden. Die Daten wurden unter Verwendung der Software XL-Miner 3.5 bioinformatisch ausgewertet und basierend auf den in Voruntersuchungen ermittelten Proteinsignaturen erfolgte die Vorhersage von „Rejektion“ bzw. „keine Rejektion“. Die Gesamtproteinkonzentration im Urin wurde unter Verwendung des Bradford-Assays bestimmt. Anschließend erfolgte mittels einer Multiplex-2D-Gelelektrophorese und der MALDI-TOF-MS Analyse die Identifizierung von Kandidatenproteinen. Ein Protein mit besonders hohen Expressionsunterschieden zwischen den beiden Gruppen wurde in einem ELISA quantifiziert und statistisch ausgewertet.

Mit Hilfe der ermittelten spezifischen Proteinsignatur konnte bei Patienten, bei denen der Zeitraum zwischen Probenentnahme und bioptisch gesicherter Rejektion unter 30 Tagen lag, das Auftreten einer Rejektion mit einer Genauigkeit von 72,7 % zugeordnet werden. Die Spezifität des Vorhersagemodells betrug 85 %. Des Weiteren konnte eine Regelbasis speziell für postoperative Proben ermittelt ($\alpha = 0,8$; Sensitivität: 85,7 %; Spezifität: 76,92 %) und durch ein unabhängiges Testsets validiert werden (Sensitivität: 78,57 %, Spezifität: 69,23 %). Außerdem wurde eine Korrelation zwischen Proteinmustern im Urin und der Art der Rejektion nachgewiesen. Es konnte dadurch sowohl eine Unterscheidung zwischen vaskulärer und interstiteller Rejektion ($\alpha = 0,6$; Sensitivität und Spezifität: 100 %), als auch zwischen Patienten mit interstitieller Rejektion und ohne Rejektion ($\alpha = 0,8$; Sensitivität: 83,3 %, Spezifität: 100 %) getroffen werden.

Durch die anschließende Multiplex-2D-Gelelektrophorese konnten ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit und ohne Rejektion festgestellt werden. Patienten mit Rejektion zeigen deutlich höhere Proteinkonzentrationen im Urin ($p = 0,04$). Bei den Ergebnissen der MALDI-TOF-MS und der darauf folgenden Datenbankanalyse sind vor allem die Proteine Alpha-1-Antitrypsin, Transferrin sowie Haptoglobin zu nennen, welche eine deutlich erhöhte Expression bei Patienten mit Rejektion aufwiesen. Nach Quantifizierung der Alpha-1-Antitrypsin-Konzentration in den Patientenurinen und anschließender Korrelation zum Gesamtproteingehalt der entsprechenden Proben konnte ein signifikanter

Unterschied ($p = 0,02$) zwischen den Gruppen mit und ohne Abstoßung ermittelt werden. Nachdem für dieses Verhältnis ein Cut-off-Wert von 0,4373 festgelegt wurde, konnten 66 % der Patientenproben mit Abstoßung korrekt der Gruppe mit Rejektion zugeordnet werden. Die untersuchten Patienten ohne Rejektion konnten mit Hilfe dieses Parameters zu 100 % richtig bestimmt werden. Zudem wurde statistisch ein Einfluss von Störfaktoren wie postoperative Harnwegsinfekte, Wundheilungsstörungen, Harntransportstörungen bzw. das Alter und Geschlecht des Patienten ausgeschlossen ($p > 0,05$) und ein signifikanter Einfluss des Verhältnisses $[AAT]:[Gesamtprotein]$ ermittelt ($p = 0,014$).

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine akute Rejektion anhand von spezifischen Proteinmustern schon wenige Tage nach der Transplantation erkannt werden kann. Für das Kandidatenprotein Alpha-1-Antitrypsin wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression nachgewiesen und es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Verhältnis von Alpha-1-Antitrypsin zur Gesamtproteinkonzentration als Parameter für eine frühzeitige Vorhersage geeignet sein könnte. Für einen künftigen klinischen Einsatz von Biomarkern zur Vorhersage von Rejektionen nach Nierentransplantation ist anzustreben, weitere potentielle Kandidaten zu identifizieren und mit Hilfe einer Kombination von verschiedenen Biomarkern ein exaktes Vorhersagemodell zu entwickeln. Zudem müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob durch regelmäßige Analysen der Proteinmuster im Urin eine frühzeitige Diagnosesicherung nicht nur im betrachteten Zeitraum von bis zu 30 Tagen nach der postoperativen Probenentnahme möglich ist, sondern auch, ob dadurch eine Vorhersage bei Patienten mit Rejektion nach mehreren Monaten ermöglicht werden kann.

1 EINLEITUNG

In der Behandlung von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz spielt neben der Dialyse die Nierentransplantation (NTX) als Therapieoption eine bedeutende Rolle.

Die erste erfolgreiche Nierentransplantation wurde 1954 von Chirurg J. Murray in Boston durchgeführt, welcher dafür 1990 den Nobelpreis erhielt. Damals fand die Transplantation zwischen eineiigen Zwillingen statt. Dieser erfolgreiche Versuch legte die Aufmerksamkeit der Ärzte auf die genetische Passgenauigkeit von Spender und Empfänger. Mit Einführung der Immunsuppression konnte bereits fünf Jahre später in Boston eine Transplantation zwischen Verwandten ermöglicht werden. Damals gelang es die Abstoßungsreaktion durch eine Ganzkörper-Bestrahlung und Gabe von Cortisol zu unterdrücken. Das Organ funktionierte 20 Jahre lang. 1962 wurde erstmals die Spenderniere eines Verstorbenen

transplantiert. Der Langzeiterfolg beruhte dabei auf Azathioprin, dem ersten Immunsuppressivum für Organtransplantationen, welches 1957 von Elion und Hitchings entwickelte wurde und zur Unterdrückung der Abstoßungsreaktion geeignet war.

1963 wurde dann auch in Deutschland von W. Brosig und R. Nagel erstmalig eine erfolgreiche NTX zwischen Mutter und Tochter vorgenommen.

Derzeit gibt es in Deutschland 67.000 dialysepflichtige Patienten und jährlich kommen 1.800 dazu. Es gab 2011 jedoch nur ca. 3.000 Spenderorgane, während sich insgesamt ca. 8.000 Patienten auf der Warteliste der Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) für eine Nierenspende befanden. In der Abbildung 1 ist die starke Nachfrage im Vergleich zum vorhandenen Angebot an Transplantationsnieren dargestellt.

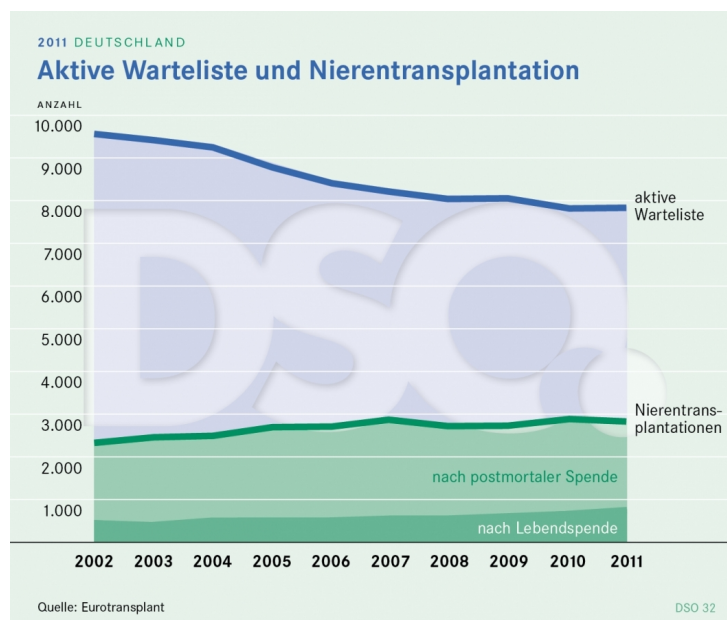


Abbildung 1: Aktive Warteliste für Nierentransplantation: *Die Patientenzahl auf der aktiven Warteliste für eine Niere ist im Vergleich zum Vorjahr konstant hoch geblieben.*
[Quelle: Jahresbericht der DSO 2011]

Die Statistik über den Anteil der Lebendspenden von 2011 (Abb. 2) zeigt, dass 2.055 Nieren nach postmortaler Organspende und im Vergleich dazu nur 795 nach einer Lebendspende transplantiert wurden. Somit sind mit 72,1 % weiterhin deutlich mehr postmortale Organspenden als Lebendspenden durchgeführt worden.

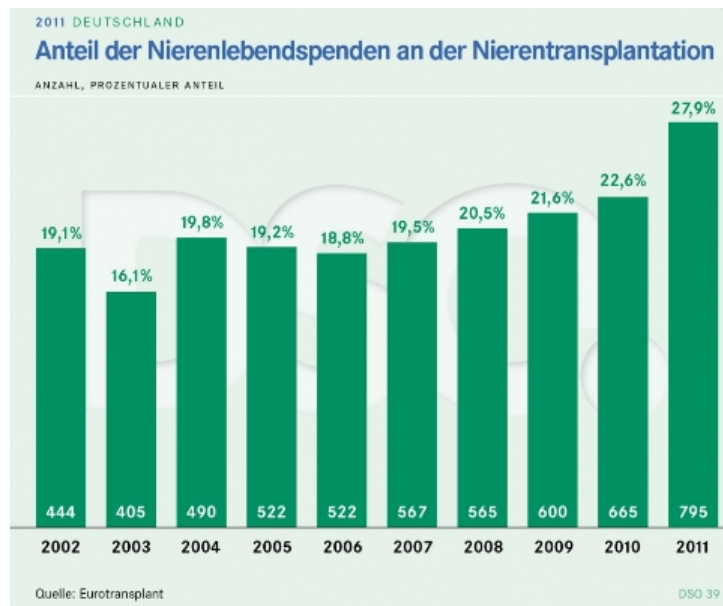


Abbildung 2: Anteil der Nierenlebendspenden an der Nierentransplantation: 2011 zeigte sich eine steigende Tendenz und der Anteil lag bei 27,9 %.

[Quelle: Jahresbericht der DSO 2011]

Die durchschnittliche Wartezeit auf ein Organ beträgt in Deutschland vier bis fünf Jahre. Wird ein Organ transplantiert, so liegt die 5-Jahres-Transplantatfunktionsrate bei postmortalen Spenden bei 71,1 %, was durch eine längere Ischämiezeit des Organs bedingt ist, und nach Lebendtransplantationen bei 85,6 %. Insgesamt liegt also die Funktionsrate der Transplantate fünf Jahre nach der NTX bei 73,9 %, was geringfügig niedriger ist als im internationalen Vergleich (79,3 %, Abb. 3).

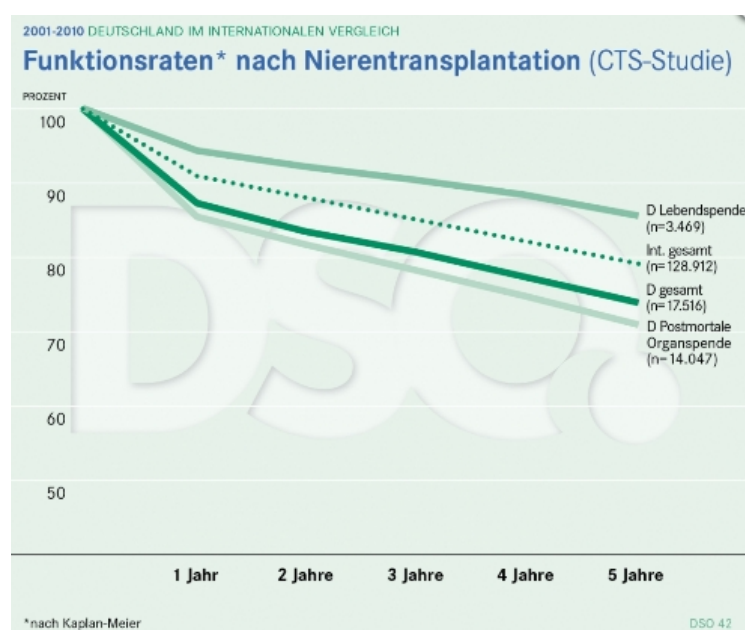


Abbildung 3: Funktionsrate des Transplantats nach Nierentransplantation

Mit einer Transplantation erhält der Patient somit einen erheblichen Zugewinn an Lebensqualität. Darüber hinaus ist aber auch die Mortalität geringer als bei Patienten, welche dialysiert werden. Die Gefahr in den ersten Wochen nach der Operation besteht jedoch in der sog. akuten Abstoßungsreaktion, welche möglichst früh erkannt werden sollte, um einem Funktionsverlust medikamentös vorzubeugen bzw. entgegenzuwirken und die transplantierte Niere zu schützen. Dazu trägt das postoperative Transplantat-Monitoring bei.

Eine frühzeitige und akkurate Erkennung einer Nierenfunktionsverschlechterung im Rahmen einer Rejektion bildet die Grundlage zur Verhinderung einer chronischen Abstoßung sowie zum Erhalt der Organfunktion und kann eine Verbesserung der Prognose des Patienten bewirken.

1.1 Indikationen für eine Nierentransplantation

Kommt es bei einem Patienten zu einer sog. terminalen Niereninsuffizienz, so muss die Organfunktion mittels regelmäßiger Dialyse ersetzt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht im Ersatz des gesamten Organs im Rahmen einer Nierentransplantation.

Die häufigsten Ursachen für ein terminales Nierenversagen sind Nierenkomplikationen, welche mit einem insulinabhängigen Diabetes mellitus vergesellschaftet sind und die Glomerulonephritis. Abbildung 4 stammt aus der QuaSi-Niere Statistik vom Jahr 2006, in der die Ursachen für eine Dialysepflicht in Deutschland aufgeschlüsselt wurden.

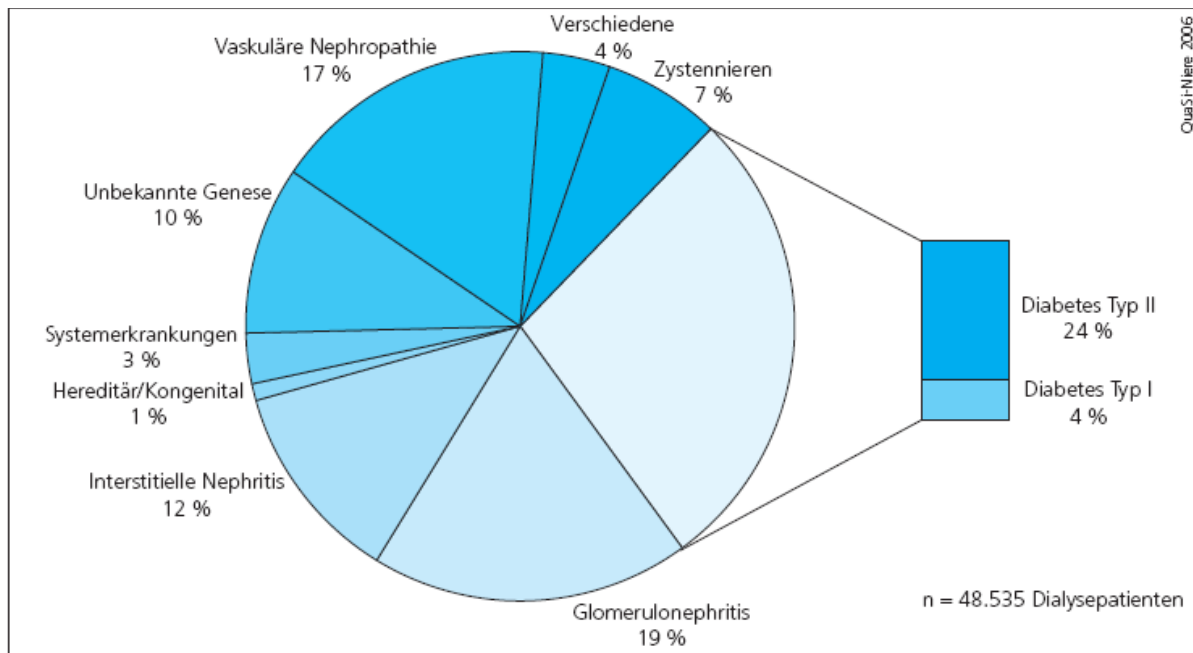


Abbildung 4: Diagnoseverteilung aller in der QuaSi-Niere Statistik 2006 erfassten Dialysepatienten in Deutschland (Prävalenz) [Quelle:]

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die Hauptdiagnosen gelistet, welche 2011 zahlenmäßig in Deutschland zu einer Nierentransplantation geführt haben. Dabei macht das chronische nephritische Syndrom den größten Teil aus.

Tabelle 1: Indikationen für eine Nierentransplantation mit ICD-10 Hauptdiagnose bei Neuanmeldung (*Bei einem Patienten sind mehrere Hauptdiagnosen möglich*) [Quelle:]

Indikationen zur Nierentransplantation	
Chronisches nephritisches Syndrom [N 03]	596
Zystische Nierenkrankheit [Q 61]	494
Primär insulinabhängiger Diabetes mellitus (Typ-1-Diabetes) [E 10]	394
Chronische Nierenkrankheit [N 18]	323
Hypertensive Nierenkrankheit [I 12]	277
Nephrotisches Syndrom [N 04]	155
Chronische tubulointerstitielle Nephritis [N 11]	83
Nicht primär insulinabhängiger Diabetes mellitus (Diabetes mellitus Typ 2) [E11]	77
Arzneimittel- und schwermetallinduzierte tubulointerstitielle und tubuläre Krankheitszustände [N14]	65
Nicht näher bezeichnetes nephritisches Syndrom [N 05]	52
	insg.: 2.516 Fälle

1.2 Abstoßungsreaktion

Nach der Transplantation ist die Abstoßungsrate mit ca. 10 – 30 % besonders hoch und damit die Transplantatfunktion stark gefährdet. Dieser Sachverhalt fordert ein frühes Erkennen und eine rechtzeitige Behandlung, um das Transplantatüberleben zu sichern.

Bei einer Nierentransplantation wird eine allogene Transplantation durchgeführt, d.h. ein Organ wird zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen der gleichen Spezies transplantiert. Die Problematik dabei besteht in der Bildung von sog. Allogen-Antikörpern, welche die Immunantwort des Empfängers auf das genetisch fremde Gewebe des übertragenen Organs darstellen. Die Folge davon ist eine Abstoßungsreaktion.

1.2.1 Einteilung der Abstoßungsreaktionen

Die Abstoßungsreaktionen werden anhand ihrer Pathogenese und ihres zeitlichen Verlaufs in verschiedene Typen eingeteilt:

Die *hyperakute Abstoßung* erfolgt bereits wenige Stunden nach der Transplantation. Es handelt sich dabei um eine Antikörperreaktion des Empfängers gegen das Transplantat, d.h. der Patient bildet zytotoxische Antikörper gegen das Nierenendothel, was eine Thrombose zur Folge hat. Diese Gefäßverschlüsse in der TX-Niere machen eine adäquate Durchblutung des Organs unmöglich. In diesem Fall muss das Organ sofort entfernt werden. Durch die Einführung des Crossmatches vor der Transplantation und einer organisierte Zuordnung der Organe durch die Eurotransplant International Foundation, welche sich nach der bestmöglichen Übereinstimmung richtet, sind hyperakute Reaktionen stark rückläufig.

Die *akute Abstoßung* entwickelt sich vorwiegend durch die humorale Abstoßungsreaktion des Empfängers mit zellulären Komponenten. Sie findet bereits wenige Tage nach dem Erhalt des Organs statt.

Kommt es zu innerhalb von Tagen bis Wochen zu einer Rejektion spricht man von der sog. *akuten Abstoßung*. Die Bezeichnung wird unabhängig vom Zeitpunkt der stattgefundenen Transplantation gebraucht, wobei jedoch die Wahrscheinlichkeit dafür sinkt, je länger der Eingriff zurückliegt. Sie ist durch eine zelluläre Abstoßung mit einer möglichen humoralen Komponente charakterisiert. Durch die T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion wird eine Endothelitis hervorgerufen.

Eine weitere Form der Abstoßung ist die *chronische Abstoßung*, auch *chronische Transplantatnephropathie* genannt. Sie entwickelt sich innerhalb von Monaten bis Jahren und führt zum kontinuierlichen Funktionsverlust und damit zum Versagen des Transplantats. Dabei kommt es zu einer obliterierenden Transplantatvaskulopathie, welche kontinuierlich fortschreitet. Es handelt sich um eine späte zelluläre und Antikörper-vermittelte

Immunreaktion, die zur Proliferation der Endothelzellen und damit ebenfalls zu einem Gefäßverschluss führt. Die dadurch entstehende Verschlechterung der Durchblutung führt schließlich zum Organverlust.

Für eine genaue Differenzierung der Formen ist eine Stanzbiopsie des Transplantates nötig. Hierbei wird nach möglichen Veränderungen der Glomeruli, Tubuli, Gefäße und des Interstitiums gesucht. Damit ist auch eine Unterscheidung zwischen einer vaskulären und interstitiellen Abstoßung bzw. Mischformen durch den Pathologen möglich.

Bei dem Verdacht auf Rejektion nach Nierentransplantation wird für die Einschätzung der Biopsie ein internationaler Standard für die histologischen Kriterien genutzt. Die sog. BANFF-Kriterien wurden erstmalig 1991 entworfen und 1993 von SOLEZ et al. verfasst. Inzwischen wurden sie mehrmals überarbeitet. Die derzeit gültige Klassifikation (BANFF 97) wird im Abschnitt 1.3.2, Tabelle 4 genauer erläutert.

1.2.2 Immunologischer Ablauf der Rejektion

Man unterscheidet bei der menschlichen Immunabwehr prinzipiell zwei Wege der Erkennung von körperfremdem Material. Diese werden als „indirekte“ und „direkte“ Alloerkennung und Immunantwort bezeichnet (siehe Abbildung 5).

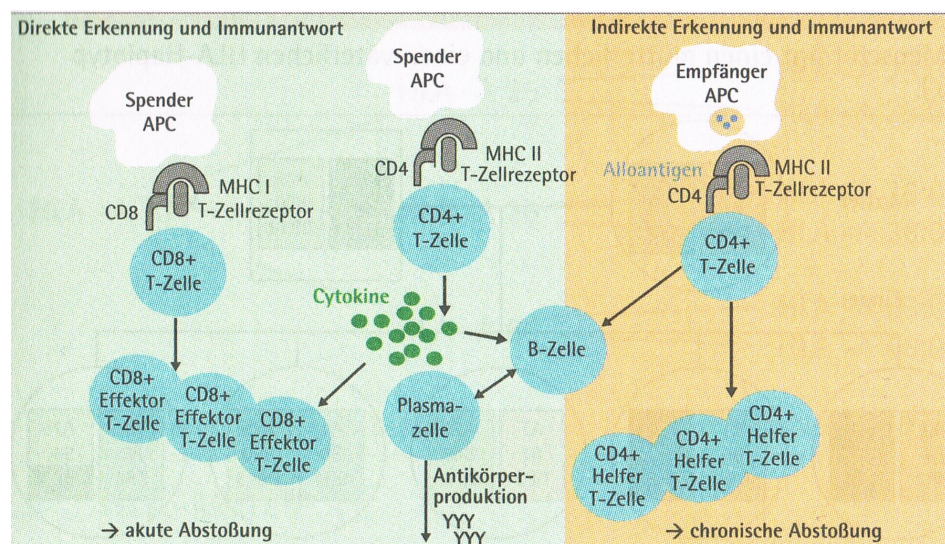


Abbildung 5: Übersicht zur Erkennung und Immunantwort bei einer Abstoßungsreaktion

[Quelle:]

Bei der chronischen Abstoßungsreaktion wird davon ausgegangen, dass die Spenderantigene des Transplantats ins lymphatische Gewebe des Patienten gelangen. Dort werden es phagozytiert und von antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Empfängers präsentiert.

Schließlich werden sie von T-Helferzellen des Empfängers erkannt. Dieser Weg der Antigenerkennung wird über CD4⁺-Zellen vermittelt.

Bei der akuten Rejektion erreichen die T-Lymphozyten des Empfängers über den Blutweg das Transplantat und durch das Erkennen des fremden Organs werden sie aktiviert. Bei der direkten Erkennung und Immunantwort sind zytotoxische T-Zellen und präformierten Antikörpern entscheidend.

Für beide Wege jedoch spielen die sog. MHC-Proteine eine besondere Rolle.

1.2.2.1 Das HLA-System

1958 entdeckte der Pariser Arzt J. Dausset das HLA-System (human leukocyte antigen system). Die HLA-Moleküle spielen eine Rolle bei der Immunerkennung und sind bezüglich der Transplantationmedizin für die Gewebsunterschiede zwischen Menschen verantwortlich. Der Major Histocompatibility Complex (MHC) umfasst eine Gruppe von Genen, die auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert sind. Die Gene codieren die HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Proteine (Alloantigene). Sie sind durch eine Vielzahl von Polymorphismen gekennzeichnet. Das erklärt die große Anzahl der HLA-Proteine. Tabelle 2 zeigt die bisher bekannte Anzahl von Allelen je HLA-Genort. Da sowohl ein mütterliches als auch ein väterliches HLA-Gen weitergegeben wird, ergibt sich eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten und für eine Transplantation resultiert die Schwierigkeit, eine exakte Übereinstimmung der HLA-Formen zwischen Spender und Empfänger zu finden.

Tabelle 2: Übersicht über die derzeit bekannten HLA-Antigene und HLA-Allele

[Quelle:]

		Anzahl der bekannten HLA-Antigene	Anzahl der bekannten HLA-Allele
HLA-Klasse-I	HLA-A	28	1601
	HLA-B	60	2125
	HLA-C	10	1102
HLA-Klasse-II	HLA-DRB1	21	928
	HLA-DQB1	9	153

HLA-Moleküle sind Heterodimere, die an der Zelloberfläche exprimiert werden. Man unterscheidet drei Klassen. Dabei sind Klasse I und II für die Transplantationsmedizin von Bedeutung. HLA-Klasse-I-Antigene werden auf kernhaltigen Zellen und Thrombozyten exprimiert. HLA-Klasse-II-Antigene werden nur auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie B-Zellen, aktivierten T-Zellen (Effektorzellen), endothelialen Zellen und Makrophagen exprimiert.

Derzeit werden in Transplantationszentren HLA-A und HLA-B (Klasse I) sowie HLA-DR (Klasse II) als relevante Loci analysiert. Unterschiede in diesen Gewebsmerkmalen können sowohl serologisch mittels eines komplement-abhängigen Lymphozytotoxizitätstests (CDC), als auch mittels PCR identifiziert werden. Erst nach dieser Typisierung der Gewebemerkmale von Empfänger und Spender erfolgt die Zuteilung von Spendeorganen durch Eurotransplant International Foundation. Bei diesem HLA-Match wird bestimmt, wieviele unterschiedliche Antigene (Mismatch) zwischen den beiden Individuen vorkommen. Das ist jedoch nur eines von verschiedenen Kriterien wie Wartezeit, Dringlichkeit oder Blutgruppe, welche für die Entscheidung über die Zuordnung (Allokation) des Spenderorgans zum Empfänger von Bedeutung sind.

1.2.2.2 Die akute Rejektion

Die akute Abstoßungsreaktion verläuft überwiegend zellulär vermittelt ab und ist nur zu einem kleinen Teil humoral vermittelt.

Eine überwiegend *zellulär vermittelte akute Abstoßungsreaktion* wird als *interstitielle Rejektion* bezeichnet. Durch die Transplantation gelangen hierbei antigenpräsentierende Zellen (APC) des Spenders in die Blutbahn des Empfängers. Die zytotoxischen T-Zellen, welche einen CD8⁺-Korezeptor tragen, erkennen auf diesen APC des Spenders den sog. MHC-I-Rezeptor, welcher Fragmente von proteolytisch gespaltenen „fremden“ Antigenen trägt. Dieser Kontakt führt zur Ausbildung von Effektorzellen. Diese aktivierten T-Zellen können nun zytotoxische Proteine wie Perforine und Proteasen synthetisieren, welche zum Untergang dieser APC führen.

T-Lymphozyten mit einem CD4⁺-Korezeptor erkennen „fremde“ Antigene, die ihnen über MHC-II-Rezeptor auf Makrophagen bzw. B-Lymphozyten des Spenders präsentiert werden. Durch diesen Rezeptorkontakt werden sie zu aktivierten T-Zellen, welche zelllinienspezifisch Zytokine produzieren, z.B. Interleukin-2, IFN γ , TNF α . Durch diese Zytokinbildung werden zum einen weitere T-Helferzellen aktiviert, aber es bewirkt auch die Umwandlung der B-Zellen zu Plasmazellen. Diese Immunzellen bilden schließlich spezifische Antikörper gegen das fremde Antigen. Somit kommt es zur Aktivierung des Immunsystems des Empfängers und zum Angriff gegen das erhaltene Organ. Das Transplantat wird dadurch in seiner Funktion geschädigt und zerstört.

Da sich der überwiegend kleinere Anteil der *Antikörper-vermittelten akuten Abstoßungen* an den Gefäßendothelien abspielt, wird diese Art als *vaskuläre Rejektion* bezeichnet. Hierbei kommt durch den Angriff von Antikörpern auf die Antigene, welche sich auf den

Endothelzellen des Spenders befinden, und unter Mitbeteiligung des Komplementsystems zu Gefäßnekrosen und Gefäßthrombosen, die zur Infarzierung des Transplantats führen können.

1.3 Derzeitiges postoperatives Vorgehen bei Verdacht auf eine Abstoßungsreaktion

Zu den typischen Komplikationen nach der NTX gehören eine verzögerte Funktionsaufnahme des Transplantats, akute Nebenwirkungen der Immunsuppression, die operativen Komplikationen wie Blutungen, Wundheilungsstörungen, Gefäßverschlüsse, Ureterstenosen oder Lymphozelen sowie die frühe akute Abstoßungsreaktion.

Daher ist eine intensive, postoperative Nachsorge nötig, wobei die verschiedenen Aspekte kontrolliert werden können.

1.3.1 Immunsuppression

Mit der Einführung der Immunsuppressiva ging die Abstoßungsrate der Transplantate enorm zurück. Ziel ist es, die akute und chronische Abstoßung zu verhindern sowie Nebenwirkungen und die Nephrotoxizität minimal zu halten.

Die derzeitigen Leitlinien der Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) - Transplant Work Group empfehlen bereits vor der Transplantation mit der immunsuppressiven Therapie zu beginnen.

Dabei ist eine Kombinationsbehandlung und eine initiale Induktionstherapie angeraten, wobei hier als erste Wahl ein IL2-Blocker und bei Risikopatienten ein Lymphozyten-Depletion befürwortet wird. Als Erhaltungstherapie wird die Kombination aus Calcineurin-Inhibitor (z.B. Tacrolimus oder Cyclosporin) und ein Proliferationshemmer (Mycophenolatmofetil (MMF), Mycophenolsäure (MPA)) mit oder ohne Steroid angewendet. Die mTOR-Inhibitoren (Everolimus, Sirolimus) kommen nach der kompletten Wundheilung zum Einsatz. Besteht der Verdacht einer Rejektion, sollte diese mittels sofortiger Stanzbiopsie abgeklärt werden. Bei Vorliegen einer zellulären Rejektion, d.h. einer tubulointerstitiellen Rejektion oder einer vaskulären Endothelitis sollte als Therapie der ersten Wahl initial die Behandlung mit Kortikosteroiden als Pulstherapie erfolgen. Bei Verdacht auf eine humorale Rejektion, d.h. beim Nachweis des Komplementspaltprodukts C4d in den peritubulären Kapillaren, erfolgt die Behandlung mit Hilfe einer oder aber der Kombination folgender Therapiealternativen: Plasmaaustausch, Immunglobuline i.v., Anti-CD20-Antikörper oder Lymphozyten-depletierende Antikörper.

Das gesamte Behandlungskonzept wird dabei stets individuell auf den Patienten und seine Grund- und Begleiterkrankungen bzw. sein klinisches Wohlbefinden zugeschnitten, denn eine zu geringe Dosierung birgt die Gefahr einer Abstoßung. Eine zu hohe Dosis verhindert diese zwar, jedoch wird die Abwehr des Patienten dann so geschwächt, dass er anfällig für Infektionen, z.B. durch das CMV oder Polyoma-Virus, bis hin zur Entstehung einer Tumorerkrankung wird. Bei der Behandlung mit verschiedenen immunsuppressiven Medikamenten treten jedoch auch nicht-immunologische Nebenwirkungen wie Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Nephrotoxizität auf, welche behandlungsbedürftig sind.

1.3.2 Klinische Diagnostik

Um eine Abstoßung und damit einer Funktionsverschlechterung des neuen Organs vorzubeugen, werden postoperativ derzeit verschiedene klinische Parameter beobachtet, welche helfen sollen, eine Rejektion möglichst frühzeitig zu erkennen. Auch hierfür wurden 2010 von der KDIGO - Transplant Work Group Empfehlungen veröffentlicht.

Es sollen sowohl postoperative Blutuntersuchungen auf dialysepflichtige Substanzen wie Kreatinin und Harnstoff, eine Flüssigkeitsbilanzierung und eine Kontrolle mit Ultraschall durchgeführt werden. Des Weiteren werden die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und einer möglichen Proteinurie vorgeschlagen. Bei den genannten Optionen handelt es sich jedoch um unspezifische Parameter, die eine Funktionsverschlechterung im Rahmen einer akuten Rejektion meist zu spät feststellen.

Besteht bezüglich der Parameter ein Verdacht auf eine Rejektion, sollte daher sofort eine Nierenbiopsie durchgeführt werden, um die Diagnose zu sichern und Informationen über die Schwere und Art der Reaktion zu erlangen. Die Nierenbiopsie gilt als aussagekräftigste Maßnahme für die Erkennung einer Abstoßung und ist somit der Goldstandard zur Diagnostik der Rejektion. Welche klinischen Zeichen eine Indikation zur Biopsie bilden, wurde nach Ott und Wolf et al. in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Indikationen zur Nierenbiopsie (modifiziert nach Ott und Wolf et al.)

<u>Indikationen zur Nierenbiopsie</u>
- primäre Funktionslosigkeit über 5 – 10 Tage
- über 15 % Kreatininanstieg pro Jahr
- akuter Kreatininanstieg oder Nichtansprechen auf eine empirische Therapie einer ersten akuten Rejektion
- vor Entscheidung zu einer Rescuetherapie einer schweren Rejektion

- bei V.a. eine BK-Virus-Nephropathie
- Einschränkung der Nierenfunktion im Langzeitverlauf und / oder Proteinurie

Für die Befundung einer Nierenbiopsie gibt es einen internationalen diagnostischen Standard. In der nachfolgenden Tabelle 4 ist die Klassifikation der Rejektion nach der BANFF-Einteilung aufgeschlüsselt. Die letzte BANFF-Konferenz erfolgte im Juni 2011 in Paris.

Tabelle 4: BANFF 97 Diagnosekategorien für Rejektionen bei Nierentransplantatbiopsien ,
Update 2009

<u>Einteilung des Schweregrades der Tx-Nierenschädigung</u> <u>modifiziert nach Sis et al. 2010</u>	
1. Normal (siehe Definition)	
2. Antikörper-vermittelte (humorale) Rejektion (Überschneidungen mit Kategorie 3 - 6 möglich)	
Basierend auf der Dokumentation von zirkulierenden anti-Donor-Antikörper, C4d und Transplantatpathologie.	
<u>C4d-Deposition ohne morphologische Zeichen einer aktiven Rejektion</u>	
C4d+, Dokumentation zirkulierender anti-Donor-Antikörper, keine Zeichen akuter oder chronischer Rejektionen. Fälle mit gleichzeitigen Borderline - Veränderungen werden als unbestimmt betrachtet.	
a) akute Antikörper-vermittelte Rejektion	
C4d+, Dokumentation zirkulierender anti-Donor-Antikörper, morphologische Zeichen einer akuten Gewebsschädigung:	
I	ATN-ähnliche minimale Inflammationen
II	Kapillaren und / oder glomeruläre Inflammation (ptc / g > 0) und / oder Thromosen
III	Arteriell – v3
a) chronisch aktive Antikörper-vermittelte Rejektion	
C4d+, Dokumentation zirkulierender anti-Donor-Antikörper, morphologische Zeichen einer chronischen Gewebsschädigung wie glomeruläre Doppelkonturen / Lamellierung der Basalmembran in peritubulären Kapillaren und / oder interstitielle Fibrose / tubuläre Atrophie und / oder intimale Fibrosen in Arterien	
3. Borderline -Veränderungen: Verdacht auf akute T-zell-vermittelte Rejektion (kann mit Kategorie 2, 5 und 6 übereinstimmen)	
Diese Kategorie wird genutzt, wenn keine intimale Arteritis, aber Foki einer geringen Tubulitis vorliegen (1 bis 4 mononukleäre Zellen pro Tubulusquerschnitt) <u>und</u> mindestens 10 bis 25 % des Interstitiums rundzellig infiltriert sind.	
4. T-Zell-vermittelte Rejektion (Überschneidungen mit Kategorie 2, 5 und 6 möglich)	
a) akute T-Zell-vermittelte Rejektion	
Typ (Grade)	Histopathologische Befunde
IA	signifikante interstitielle Infiltrationen (> 25 % Rundzellinfiltrationen im Parenchym) <u>und</u> eine fokale, moderate Tubulitis (> 4 mononukleäre Zellen / tubulärem Querschnitt oder eine Gruppe von 10 Tubuluszellen)

IB	signifikante interstitielle Infiltrationen (> 25% Rundzellinfiltrationen im Parenchym) <u>und</u> eine fokale, schwere Tubulitis (> 10 mononukleäre Zellen / tubulärem Querschnitt oder eine Gruppe von 10 Tubuluszellen)
IIA	milde bis moderate Arteritis der Intima
IIB	schwere intimale Arteritis mit Einengung des Lumens > 25%
III	Transmurale Arteritis und / oder arterielle fibrinoide Veränderungen <u>und</u> medialer Nekrose der glatten Muskelzellen mit begleitender lymphozytären Infiltration
b) chronisch aktive T-Zell-vermittelte Rejektion	
5. Interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie, ohne Hinweise auf spezifische Ätiologie	
Grad I, II und III können die unspezifische vaskuläre und glomeruläre Sklerose einschließen, jedoch wird der Schweregrad durch die tubulointerstitiellen Befunde bestimmt.	
Typ (Grade)	Histopathologische Befunde
I	Milde interstinale Fibrose und tubuläre Atrophie (< 25 % des Kortex)
II	Moderate interstinale Fibrose und tubuläre Atrophie (26 - 50 % des Kortex)
III	Schwere interstinale Fibrose und tubuläre Atrophie / Tubulusverlust (> 50 % des Kortex)
6. Andere: Veränderungen, die nicht auf eine akute und / oder chronische Rejektion zurückgeführt werden können.	

Eine engmaschige Nachsorge nach der NTX dient der frühestmöglichen Erkennung von Komplikationen und ermöglicht somit die zeitnahe Anpassung der Immunsuppression. Durch ein unmittelbares Eingreifen und eine eventuelle Umstellung der Therapie ist das Abwenden von schlimmeren Folgen bzw. das Eindämmen der Rejektion möglich, wodurch ein optimales Patienten- und Organüberleben sichergestellt wird.

1.4 Möglichkeiten der Proteomik zur Identifizierung neuer Biomarker

Mit den derzeit verfügbaren Parametern kann eine Rejektion erst spät erkannt werden und dann sind in der Nierenbiopsie, einem invasiven Verfahren, welches auch mit Komplikationen behaftet ist, bereits Schädigungen an der Niere festzustellen. Daher besteht die dringende Notwendigkeit, Marker zur Früherkennung der akuten Rejektion zu entwickeln, welche dann eine frühere Therapie ermöglichen. Bisher konnte sich jedoch noch keiner der publizierten Marker in der klinischen Praxis etablieren.

Die Anforderungen an einen Biomarker, der Verwendung im klinischen Alltag finden soll, sind hoch. Für die Einführung eines neuen Markers muss seine Bestimmung einfach und wiederholbar sein und daher sollte der Marker aus leicht zu gewinnendem biologischem Material, wie z.B. Urin oder Serum, stammen. Des Weiteren muss er über eine lange Zeit stabil im diesem Medium vorliegen und auch pH-Schwankungen oder andere in der pathologischen Situation veränderte Bedingungen tolerieren. Außerdem sollte eine

Kombination mehrerer Markern angestrebt werden, um durch Nutzen der verschiedenen Sensitivitäten und Spezifitäten eine möglichst exakte Unterscheidung zwischen „Rejektion“ und „keine Rejektion“ zu treffen.

Die Proteomanalyse stellt eine Möglichkeit der Identifizierung neuer Markerproteine dar und bietet eine Reihe von Möglichkeiten, um humanes Material auf potentielle Biomarker zu untersuchen. Hierbei ist sowohl die Massenspektrometrie als auch die 2D-PAGE zu nennen.

Die *2-dimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (2D-PAGE)* gilt als beste Möglichkeit zur Auftrennung von Proteinen, in einem weiten Molekularbereich, u.a. im auch Urin. Mit der Erweiterung im Sinne der Multiplex-2D-Gelelektrophorese ist es möglich, gleichzeitig mehrere Proben miteinander auf einem Gel bezüglich ihrer Proteinexpression zu vergleichen. Die 2D-Gelelektrophorese gekoppelt mit einer massenspektrometrischen Methode repräsentiert die Technik der Wahl für eine Analyse von Urinproteinen.

Die *SELDI-TOF-MS (Surface-enhanced Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass spectrometry)* stellt eine Kombination aus Massenspektrometrie und ProteinChip®-Technologie dar. Mit dieser Methode konnten durch unsere Arbeitsgruppe im Urin bezüglich einer Rejektion schon verschiedene relevante Proteinmassen zur Unterscheidung von „mit Rejektion“ und „ohne Rejektion“ aufgezeigt werden. In der Literatur findet man weitere Publikationen, welche eine Reihe von Proteinmassen beschreiben, die zur Unterscheidung von Patienten mit und ohne Rejektion geeignet sind. Auch O’Riordan et al. konnten in einer Veröffentlichung zeigen, dass die Massenspektrometrie mittels SELDI-TOF zur Identifizierung neuer Biomarker für eine akute Rejektion geeignet ist.

Die *MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry)* stellt eine weitere Möglichkeit zur Ionisierung und zur anschließenden Identifizierung von Proteinen dar. Ein Beispiel der möglichen Anwendung dafür sind Studien von Schaub et al. und Oetting et al., welche so einen Zusammenhang zwischen dem Protein Beta-2-Mikroglobulin im Urin und einer akuten Rejektion herstellen konnten.

Es wurden in den letzten Jahren zunehmend Arbeiten publiziert, die das Potential der Proteomik für die Identifikation und Charakterisierung von Biomarkern darlegen. Dabei zeigte sich auch, dass die Urin-Proteomik nicht nur für die Diagnose, sondern auch für die Prognosebewertung von Nierenerkrankungen und anderen Erkrankungen geeignet ist.

Die erwähnten Methoden bilden somit einen Ansatzpunkt für neue Optionen zur Diagnostik von Abstoßungsreaktionen. Möglicherweise könnten diese schon früher und präziser eine Vorhersage erlauben als die derzeitig verwendeten klinischen Parameter. Obwohl die Nachfrage nach Biomarkern aus leicht zu gewinnenden Medien in der

Nierentransplantationsmedizin sehr groß ist, konnten bisher noch keine Marker im klinischen Alltag etabliert werden. Die große Herausforderung besteht darin, eine Rejektion definiert und unabhängig von Störfaktoren wie Infektion oder toxischen bzw. ischämischen Erkrankungen vorherzusagen.

2 ZIELE DER ARBEIT

In der Behandlung der terminalen Niereninsuffizienz ist neben der Dialyse die Nierentransplantation die wichtigste Therapieoption.

Die Entwicklung einer Abstoßungsreaktion des neuen Organs, welche immer mit einem Schaden und dessen Funktionseinschränkung verbunden ist, kann schon kurze Zeit nach der Transplantation stattfinden. Demnach ist eine frühzeitige und zuverlässige Erkennung der Verschlechterung der Nierenfunktion im Rahmen einer Rejektion von höchster Priorität, um eine optimale Funktionsfähigkeit für einen möglichst langen Zeitraum zu gewährleisten.

Derzeit werden postoperativ Blutuntersuchungen auf dialysepflichtige Substanzen wie Kreatinin und Harnstoff, die Flüssigkeitsbilanzierung und die Kontrolle mit Ultraschall durchgeführt, um eine Funktionsverschlechterung festzustellen. Diese Parameter sind jedoch sehr unspezifisch und für eine frühzeitige Erkennung einer Abstoßung ungeeignet, da sie erst auffällig werden, wenn die Organfunktion bereits eingeschränkt und ein Schaden am Organ entstanden ist.

Die Nierenbiopsie ist zur Zeit zwar der Goldstandard zur sicheren Diagnose einer Abstoßung, es handelt sich aber um ein invasives Verfahren, welches mit Komplikationen verbunden sein kann und mit dem die Abstoßung erst in einem klinisch fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird.

Eine sichere Früherkennung der Rejektion ist derzeit nicht möglich. Dies ist jedoch Voraussetzung für eine frühzeitige Intervention einschließlich der Anpassung der medikamentösen Therapie mit dem Ziel der Verhinderung eines Funktionsverlustes des Organs. Deshalb sind neue Biomarker erforderlich, die für eine minimal- oder nicht-invasive Diagnostik an Blut- oder Urinproben eingesetzt werden können.

Ziel dieser Arbeit ist es, Biomarker im Urin zu identifizieren, die eine frühzeitige Diagnose der Rejektion erlauben. In ersten vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten mittels SELDI-TOF-MS spezifische Proteinmuster im Urin definiert werden, welche zum Zeitpunkt der bioptischen Sicherung mit einer Rejektion korrelieren. Diese Proteinmuster sollen hinsichtlich ihrer Wertigkeit für die Erkennung einer Rejektion an postoperativ gewonnenen Urinproben überprüft werden.

Die Analyse dieser postoperativen Urinproben mittels SELDI-TOF-MS soll zeigen, ob ein Proteinmuster zur Vorhersage einer Rejektion erstellt werden kann. Zudem wird eine Überprüfung der Korrelation des Proteinmusters im Urin und der Art der Rejektion erfolgen.

Darüber hinaus sollen differentiell exprimierte Proteine durch die Multiplex-2D-Gelelektrophorese und einer an den tryptischen Verdau anschließenden MALDI-TOF-MS ermittelt werden. Die identifizierten Kandidatenproteine werden im letzten Schritt durch spezifische ELISA-Messungen quantifiziert und validiert.

3 METHODIK

3.1 Untersuchungsmaterialien

3.1.1 Patientengut

Als Untersuchungsmaterial standen insgesamt 110 Urinproben von Patienten zur Verfügung, welche eine Nierentransplantation in der Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Jena erhalten haben. Diese Urinproben wurden nach ihrer Entnahme unbehandelt bei - 80 °C eingefroren. Die Proben setzten sich zusammen aus je 55 Urinen von Patienten, welche nach der NTX eine Rejektion, die bioptisch gesichert wurde, aufwiesen, und 55 Urinproben von Patienten, welche mindestens zwei Jahre nach der NTX rejektionsfrei waren.

In den folgenden Tabellen 5 bis 7 sind zu den Proben der Entnahmezeitpunkt und das jeweilige Transplantationsdatum gelistet.

Es ist darauf hinzuweisen, dass es sich bei je 39 Proben der jeweiligen Gruppe um postoperativ (am 1. – 10. Tag) entnommene Urine handelt. Die restlichen 26 Proben aus beiden Gruppen wurden zum Zeitpunkt des gesicherten Rejektionszustandes gewonnen.

Tabelle 5: Urine – Trainingsset

Patienten mit Abstoßung (n=16)			Patienten ohne Abstoßung (n=16)		
<u>Probe</u>	<u>NTX-Datum</u>	<u>entnommen</u>	<u>Probe</u>	<u>NTX-Datum</u>	<u>entnommen</u>
1	31.12.1999	02.05.2006	19	25.01.2006	26.07.2006
3	05.02.2000	03.05.2006	20	04.01.2005	26.07.2006
4	n.a.	03.05.2006	21	18.06.1996	26.07.2006
5	n.a.	03.05.2006	24	10.01.2006	18.08.2006
6	16.04.2000	03.05.2006	25	26.08.2004	18.08.2006
7	15.07.1999	05.05.2006	26	23.06.2005	30.08.2006
8	18.03.2000	05.05.2006	27	n.a.	n.a.
9	n.a.	05.05.2006	28	07.09.1999	07.09.2006
10	n.a.	22.05.2006	29	n.a.	12.09.2006
11	10.04.2000	26.05.2006	30	15.07.1999	04.10.2006
12	20.06.2000	01.06.2006	31	16.12.2002	23.10.2006
13	n.a.	01.06.2006	32	02.08.2005	24.10.2006
15	23.04.1999	06.06.2006	33	12.05.2005	24.10.2006
16	10.06.1999	26.07.2006	34	04.11.2005	04.12.2006
17	20.09.2000	26.07.2006	35	10.10.2008	04.12.2006
20	02.06.2000	08.08.2006	36	02.06.2004	06.12.2006

Tabelle 6: postoperative Urine – Testset

Patienten mit Abstoßung (n=26)				Patienten ohne Abstoßung (n=26)		
<u>Probe</u>	<u>Entnahmetag</u>	<u>NTX-Datum</u>	<u>Abstoßungs-</u>	<u>Proben-</u>	<u>Entnahmetag</u>	<u>NTX-Datum</u>

	(postoperativ)		zeitpunkt (postoperativ)		(postoperativ)	
243	9	20.01.2002	30	270	9	05.03.2002
251	9	08.02.2002	420	413	1	15.12.2002
252	9	10.02.2002	18	434	9	16.01.2003
275	9	15.03.2002	91	518	5	20.05.2003
282	5	08.04.2002	9	602	9	19.09.2003
300	9	18.05.2002	83	722	9	26.02.2004
337	5	14.08.2002	12	762	9	23.03.2004
389	9	12.10.2002	33	784	5	05.05.2004
408	9	30.11.2002	97	785	9	05.05.2004
426	5	14.01.2003	36	805	9	02.06.2004
433	9	16.01.2003	16	824	9	15.06.2004
437	9	25.01.2003	60	847	9	27.06.2004
469	5	09.03.2003	47	918	10	03.11.2004
476	7	10.04.2003	97	947	9	04.01.2005
514	9	14.05.2003	37	1004	3	20.04.2005
564	9	10.07.2003	13	1137	9	22.09.2005
582	9	23.08.2003	11	1184	3	04.11.2005
586	10	21.02.2004	23	1213	9	14.12.2005
758	1	21.03.2004	n.a.	1230	9	10.01.2006
759	9	21.03.2004	n.a.	1231	9	10.01.2006
1015	3	26.04..2005	<30	1257	9	24.01.2006
1021	4	06.05.2005	<30	1261	9	29.01.2006
1092	9	27.07.2005	60	1279	9	15.02.2006
1173	9	18.10.2005	150	1308	9	24.03.2006
1186	9	01.05.2000	96	1393	3	27.07.2006
1577	9	22.10.2005	60	1398	9	25.07.2006

Tabelle 7: postoperative Urine – weiteres Testset

Patienten mit Abstoßung (n=13)				Patienten ohne Abstoßung (n=13)		
Probe	Entnahmetag (postoperativ)	NTX-Datum	Abstoßungs- zeitpunkt (postoperativ)	Proben-	Entnahmetag (postoperativ)	NTX-Datum
1404	9	05.08.2006	8	1403	9	29.07.2006
1535	9	12.02.2007	16	1416	9	28.08.2006
1564	3	13.04.2007	24	1435	9	10.09.2006
1646	3	16.08.2007	5	1436	9	11.09.2006
1683	3	25.10.2007	8	1441	9	24.09.2006
1913	3	10.10.2008	6	1448	3	14.10.2006
1921	3	17.10.2008	5	1455	3	11.11.2006
1949	3	25.11.2008	6	1465	5	30.11.2006
2118	3	29.06.2009	7	1472	9	29.11.2006
2128	9	24.06.2009	12	1496	3	06.01.2007
2210	9	08.10.2009	33	1510	9	10.01.2007
2255	3	26.12.2009	3	1542	9	03.03.2007
2355	3	17.03.2010	34	1547	9	23.03.2007

3.1.2 Materialien

Standards, Kits, Marker, Enzyme und Antikörper

Alpha-1-Antitrypsin ELISA Kit (ab10808799): Mouse monoclonal [G11] to Alpha-1-Antitrypsin (ab9400): Rabbit polyclonal to Haptoglobin (ab97976): BSA Albumin-Standard RPN800E Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Markers <u>Refraction-2D™ Labeling Kit:</u> Hochleistungsfarbstoffe G-Dye100, 200, 300 Sequencing Grade Modified Trypsin V511A	abcam Inc., Camebridge, MA/USA abcam Inc., Camebridge, MA/USA abcam Inc., Camebridge, MA/USA PIERCE Biotechnology Inc., Rockford, IL/USA GE Healthcare, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D ^{NH} DyeAGNOSTICS GmbH, Halle, D Promega GmbH, Mannheim, D
--	--

Statistik und Datenanalyse

Ciphergen Client 3.0 Delta-2D Ettan™IPGphor™ 3 Control Software 1.1 Bruker Compass 1.3 Software (flexAnalysis 3.3, flexControl 3.3) Magellan V.3.00 Software Mascot-Datenbank 2.3 ProteinScape 2.1 SPSS 19.0 UniProtKB/Swiss-Prot (Proteindatenbank) XL-Miner 3.5	Ciphergen Biosystems Inc., Fermont, CA/USA Decodon GmbH, Greifswald, D GE Healthcare, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D Bruker Daltonics GmbH, Bremen, D Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D Matrix Science Inc., London, UK Bruker Daltonics GmbH, Bremen, D SPSS GmbH Software, München, D http://www.uniprot.org/uniprot BioControl Jena GmbH, Jena, D
--	--

3.2 Methoden

3.2.1 SELDI-TOF-MS und bioinformatische Auswertung

Die SELDI-TOF-MS (Surface-enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry) stellt eine Kombination aus Massenspektrometrie und ProteinChip®-Technologie dar und wurde erstmalig 1993 von Hutchens und Yip et al. publiziert.

Der Mechanismus beruht darauf, dass ionisch-geladene Moleküle eines komplexen Proteingemisches affinitätsbezogen an die spezifischen chromatographischen Oberflächen der

ProteinChips® binden und somit das Gemisch nach proteinspezifischen Eigenschaften fraktioniert wird. Mit der Technik ist eine hochsensitive und quantitative Analyse von komplexem Probenmaterial möglich. Von den Proben kann ein Proteinprofil erstellt werden, welches den Vergleich verschiedener Gruppen, z.B. Patienten und gesunden Probanden bzw. Patienten mit und Patienten ohne Ereignis, ermöglicht.

Bei der ProteinChip®-Analyse ist die Oberflächenladung, d.h. die Summe aus sauren und basischen Aminosäuren des Peptides bzw. Proteins, entscheidend für eine Bindung an die jeweilige Chipoberfläche. Daraus resultiert eine starke Abhängigkeit vom vorliegenden pH-Wert und es bedingt eine präzise Puffereinstellung.

Da die jeweiligen Chipoberflächen spezifisch Proteine unterschiedlicher Eigenschaften binden, hat sich zur Ermittlung des Gesamtproteingemischs von Urinproben eine kombinatorische Verwendung des Q10- und des CM10-Chips bewährt.

Die Oberflächen des Q10-Arrays fungiert als starker Anionen-Austauscher, da sie aus positiv geladenen quartären Ammonium-Gruppen bestehen. An seine Chipoberfläche binden folglich Moleküle, welche bei vorgegebenem pH-Wert negativ geladen sind.

Der ProteinChip® CM10-Array enthält negativ geladene Carboxylgruppen, bindet somit die bei einem bestimmten voreingestellten pH-Wert positiv-geladenen Proteine und wirkt als (schwacher) Kationen-Austauscher.

In den vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde die Proteinkonzentration der verwendeten Urinproben mittels Bradford bestimmt. Die Proben mussten für die Durchführung der Untersuchungen nicht verdünnt werden, da die Proteinkonzentrationen zwischen 50 und 20.000 µg/ml lag und somit eine optimale Auflösung der Proteinspektren möglich war.

3.2.1.1 Vorbereiten der ProteinChip®-Arrays Q10 und CM10

Zunächst erfolgte eine Oberflächenaktivierung der Arrays mit einem für den Array spezifischen Bindepuffer (Q10: 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) und 0,02 % Triton X-100; CM10: 0,1 M Natriumacetat (pH 4,0) und 0,02 %iges Triton X-100). Davon wurde jeweils 5 µl pro Spot für 5 min aufgetragen. Dieser Vorgang wurde anschließend noch einmal wiederholt. Nach diesem Aktivierungsschritt wurde der Puffer von der Oberfläche entfernt und es wurden 5 µl der Urinprobe aufgetragen und für 30 min in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschrte mit 5 µl des jeweiligen Bindepuffers und zwei Waschschrte mit 5 µl aufgereinigtem, protonenfreiem destilliertem Wasser (HPCL). Im dem folgenden 20- bis 30-minütigem Schritt wurde die Chipoberfläche bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde 1 µl energieabsorbierende Matrix (EAM: 5 mg Sinapinsäure,

200 µl 1 %ige Trifluoressigsäure, 200 µl Acetonitril) aufgetragen und wiederum für 5 min lichtgeschützt luftgetrocknet. Dieser letzte Schritt wurde einmal wiederholt.

3.2.1.2 Aufnahme von Urinproteinspektren mittels ProteinChip®-System PCS 4000

Anschließend erfolgte die Auswertung mittels CIPHERGEN ProteinChip® Reader System PCS 4000 und der Software CIPHERGEN Client 3.0 in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik und Anthropologie in Jena.

Die Arrayspots besitzen insgesamt 1060 Felder und werden pro Einstellung mit 265 Laserimpulsen beschossen. Somit bietet jeder Spot die Möglichkeit für vier Messungen.

Bei der durchgeführten Messung wurden drei verschiedene Laserintensitäten (Tabelle 8) genutzt und der gesamte Massenbereich in drei Einzelbereiche (LOW, MIDDLE, HIGH) aufgeteilt, um die entsprechenden Molekulargewichtsbereiche hochauflösend darzustellen.

Tabelle 8: Protokoll für die drei gemessenen Einzelbereiche LOW, MIDDLE, HIGH

	Intensität	Bereich des Molekulargewicht
LOW	2.200 nJ	0 – 20.000 Da
MIDDLE	2.500 nJ	20.000 – 80.000 Da
HIGH	3.300 nJ	80.000 – 200.000 Da

Werden die Proben mit den unterschiedlichen Laserintensitäten beschossen, verdampft die EAM und Protonen werden auf die Probe übertragen. Durch ihre positive Ladung werden die Teilchen in der Vakuumröhre des Flugzeitmassenspektrometers beschleunigt. Das Massenspektrometer besteht dabei aus einer Ionenquelle, mit welcher gasförmige Ionen erzeugt werden, einem Massenanalysator, welcher die erzeugten Ionen hinsichtlich ihres Verhältnisses von Masse zu Ladung (m/z) auftrennt und einem Detektor. Aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts bewegen sich die Moleküle unterschiedlich schnell auf den Detektor zu, der am anderen Ende der Röhre angebracht ist. Die ermittelte Flugzeit dient anschließend der Bestimmung der Masse, da sich das Molekulargewicht umgedreht proportional zur Geschwindigkeit verhält. Das Signal des Detektors wird digitalisiert und in ein Spektrum umgewandelt.

Da die Proben einen unterschiedlichen Ionengehalt aufweisen, mussten die Werte zunächst normalisiert werden. Dabei wurde ein Durchschnittswert des Gesamtionengehaltes aller Proben gebildet und die gemessenen Intensitäten der Proben um den jeweiligen Normalisierungsfaktor abgeglichen. Durch diese Normalisierung werden die Proben untereinander vergleichbar, was Voraussetzung für die weitere Analyse ist.

Des Weiteren wurde eine Peakgröße von 10 S/N festgelegt, bis zu welcher detektiert und geclustert werden soll, d.h. das Signal (S) muss 10-fach höher sein als das Rauschen (N). So wurde sichergestellt, dass ein mögliches Hintergrundrauschen die tatsächlichen Signale nicht verfälscht.

Vor dem Clustern wurde ebenfalls eine Mindestschwelle (minimum threshold) festgelegt, welche angibt, bei wie vielen Patientenspektren der Peak gleichzeitig vorhanden sein muss, um als Peak festgestellt zu werden. Dieser wurde in Abhängigkeit von der Gruppengröße zur Gesamtzahl der Patienten mit folgender Rechnung ermittelt:

$$\frac{(\text{Anzahl der Patienten der kleinste Gruppe} / 2)}{(\text{Gesamtzahl der Patienten aller Gruppen} * 100)} = \text{minimum threshold}$$

Anhand des Trainingssets konnte so mit Hilfe der Software eine Clusterliste erstellt, die auf später vermessene Testsets angewendet wurde, sodass eine vergleichende Auswertung nach definierten Peaks erfolgen konnte.

3.2.1.3 Bioinformatische Auswertung der aufgenommenen Proteinspektren

Die erhobenen Messdaten wurden in die Software XL-Miner 3.5 zur weiteren Auswertung importiert. Hier wurden zunächst die Messdaten der einzelnen Massenbereiche zusammengefügt und logarithmiert. Die Werte wurden anschließend mit Hilfe des Fuzzy C-Means Algorithmus einzelnen Gruppen zugeordnet. Unter Verwendung dieses Clustering-Algorithmus wurden für jeden Peak zwei Cluster festgelegt, in diesem Fall „mit Rejektion“ und „ohne Rejektion“. Diese Zuordnung erfolgte im Intervall von 0, was zu 100 % der Gruppe „ohne Rejektion“ entspricht, bis 1, was wiederum eine 100 %ige Zuordnung zur Gruppe „mit Rejektion“ angibt. Zum Festsetzen der Clustergrenzen wurde der Median der jeweiligen Peakintensität verwendet. Somit konnte bestimmt werden, wann sich die Intensität des Proteins an der unteren Clustergrenze befindet und es somit unterexprimiert (LOW) vorliegt und wann es sich an der oberen Clustergrenze befindet, also überexprimiert (HIGH) vorkommt. Anhand dieser Cluster wurden einkonditionale Regeln generiert, welche die Expression relevanter Proteine entweder der Gruppe „mit Rejektion“ bzw. „ohne Rejektion“ zuordnet.

Die vom Programm aufgestellte Regeln entsprechen folgendem Muster: *WENN* ‚Intensität HIGH‘ *DANN* „mit Rejektion“ bzw. *WENN* ‚Intensität LOW‘ *DANN* „ohne Rejektion“.

Allen aufgestellten Regeln wurde ein Relevanzindex nach Kiendl zugeordnet, welcher eine Bewertung der generierten Regeln ermöglichte.

Die vierkonditionale Regel wurde aus Regeln gebildet, welche in Kombination den höchsten Relevanzindex besitzen. Anhand des Expressionsmusters jeder Patientenprobe wurde die Übereinstimmung mit diesen vierkonditionalen Regeln überprüft. Daraufhin wurde jede Patientenprobe anhand ihres Proteinexpressionsmusters einer der beiden Gruppen zugeordnet. Die Vorhersagegenauigkeit dieser aufgestellten Regeln wurde anhand eines unabhängigen Testsets überprüft. Dafür wurden Sensitivität und Spezifität berechnet, indem der tatsächliche Rejektionsstatus der Proben mit dem durch die aufgestellte Regel zugeordnetem Rejektionsstatus abgeglichen wurde.

$$\frac{\text{Anzahl der richtig positiven Patienten}}{\text{Summe aus richtig positiven + falsch negativen Patienten}} = \text{Sensitivität}$$

$$\frac{\text{Anzahl der richtig negativen Patienten}}{\text{Summe aus richtig negativen + falsch positiven Patienten}} = \text{Spezifität}$$

3.2.2 Darstellung des Urinproteinprofils mittels 2D-Gelelektrophorese

Die 2-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) wurde unabhängig voneinander von Patrick O'Farrell und Joachim Klose 1975 beschrieben und ist eine häufig genutzte analytische Methode in der Proteomik. Sie stellt eine Kombination der isoelektrischen Fokussierung (IEF), d.h. der Auftrennung der Probe entsprechend ihres isoelektrischen Punkts und der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, d.h. der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, dar. Durch die kombinierte Nutzung beider Schritte kann eine hoch auflösende Auftrennung komplexer Proteingemische, wie z.B. Urin, erreicht werden. Die Durchführung wird in den folgenden Abschnitten erklärt.

3.2.2.1 Proteinfällung nach Wessel/Flügge

Zunächst wurde eine Proteinfällung der Urinprobe nach Wessel und Flügge durchgeführt. Hierfür wurden 150 µl Probe mit 600 µl Methanol versetzt. Dazu wurden 150 µl Chloroform geben, gemischt und anschließend für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zu beachten ist, dass dieser Schritt nur eine Phase ergeben darf. Im nächsten Schritt wurden 450 µl Aqua dest. zugeben, gemischt und wiederum für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die dabei entstandene obere organische Phase wurde entfernt, ohne dabei die mittlere Phase zu zerstören, welche die gefällten Proteine enthält.

Danach wurden nochmals 450 µl Methanol zugeben, gemischt und in diesem Schritt für 1 - 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und verworfen. Dann wurde die gefällte Probe luftgetrocknet und das Pellet in 100 µl Aqua dest. resuspendiert.

Nachdem die Konzentration der gefällten Probe bestimmt wurde, musste das benötigt Probenvolumen für die Anfertigung des 2D-Gelbildes ermittelt werden (siehe Ergebnisse Abschnitt 4.2, Tabelle 34). Für einen 7 cm IPG-Streifen galt der Zielwert von 60 µg Gesamtprotein, der auf dem Gel aufgetrennt wurde. Die berechneten Mengen wurde in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Vakuumzentrifuge bei 37 °C für insgesamt 35 min auf etwa 2 µl eingengt. Da auch nach mehrmaligen Zentrifugationsschritten die Probe noch nicht ausreichend eingengt war, wurde eine zweite Fällung mit 150 µl eiskaltem Acetonitril angeschlossen.

Für diese Fällung wurde die Probe drei bis vier Mal gemischt und zwischenzeitlich stets kurz auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 40 sec bei 9.000 rpm. Das Pellet wurde in 125 µl Rehydrierungspuffer (8 M Urea, 2 % Chaps, 0,5 % IPG-Puffer, 0,2 % DTT, 0,002 % Bromphenolblau-Stocklösung (1 % Bromphenolblau, 50 mM Tris-Base) resuspendiert.

3.2.2.2 Rehydrierung

Die gelöste Probe wurde in eine Spur des GE Healthcare Reswelling Tray pipettiert. Der Gelstreifen wurde mit der Gelseite nach unten möglichst luftblasenfrei auf die Probe gelegt. Als Verdunstungsschutz wurde der Streifen anschließend mit 1 - 2 ml DryStrip CoverFluid überschichtet, um das Auskristallisieren von Urea zu verhindern. Die Rehydrierung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

3.2.2.3 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Im nächsten Schritt wurden 108 µl DryStrip CoverFluid in den Aligner des GE Healthcare Ettan™ IPGphor™ 3 geben und der rehydrierte IPG-Streifen (Immobiline™ DryStrip pH 3-10, 7 cm) wurde entsprechend seiner Polung und Länge im Aligner positioniert. Dann wurden mit 150 µl Aqua dest. befeuchtete Elektrodenfilter an dem Streifenende platziert, so dass sie ca. 3 mm auf dem Gel auflagen. Anschließend wurden die Elektroden angelegt, jedoch ohne das Gel zu berühren.

In der dazugehörigen Software wurde das geeignete Protokoll entsprechend pH, Anzahl und Länge der IPG-Streifen angewählt und gestartet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Laufbedingungen für einen IPG-Streifen von 7cm, pH 3-10

IPG-Streifen	Schritt	Spannungsanstieg	Dauer in [h:min]	Voltstunden [Vh]
7cm pH 3-10	1. Step and Hold	auf 500V	01:00	0,5
	2. Gradient	auf 1.000V	01:00	0,8
	3a. Gradient	auf 8.000V	03:00	13,5
	4a. Step and Hold	auf 8.000V	1:30 bis 2:40	12,2 – 21,2
	4b. Step and Hold	auf 10.000V	0:55 bis 1:50	9,2- 36,0

Anschließend erfolgte die Inkubation in 5 ml Equilibrierungspuffer (6 M Urea, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 30 % Glycerol (99,5 %), 2 % SDS, 0,002 % Bromphenolblau). Die Equilibrierung erfolgte in zwei Inkubationsschritten für jeweils 15 min. Zunächst wurde der Streifen im Equilibrierungspuffer I (5 ml-Aliquot mit 100 mg DTT versetzt) und anschließend in Equilibrierungspuffer II (250 mg Iodacetamid zum 5 ml-Aliquot) auf einem Schüttler inkubiert.

3.2.2.4 SDS-PAGE (2. Dimension)

Die SDS-PAGE erfolgte unter Verwendung eines kommerziell verfügbaren Fertigells (Novex® 4-20% Tris-Glycerine ZOOM® Gradientengel, Life Technologies Corporation). Der IPG-Streifen wurde abgetropft und luftblasenfrei auf die Kante des Gels positioniert und anschließend mit 250 µl verflüssigter Agarose überschichtet. In die Markertasche wurden 5 µl Rainbow-Marker (RPN800E Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Markers, GE Healthcare) pipettiert. Im letzten vorbereitenden Schritt wurde die Elektrophoresekammer mit 800 ml 1fach-MES-Puffer (500 mM MES, 500 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 % SDS) befüllt und nach folgendem Protokoll gestartet (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Laufbedingungen für die 2D-PAGE

	Spannung in [V]	Stromstärke in [mA]	Arbeit in [W]	Dauer in [min]
Laufbedingungen in Invitrogen XCell <i>SureLock</i> ™Mini-Cell	125	100	30	125

Anschließend konnte das Gel in den Färber überführt werden.

3.2.2.5 Fixieren, Färben und Entfärben

Zunächst wurde das Gel in Fixierungslösung (40 % Ethanol und 10 % Essigsäure) für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde es für mehrere Stunden in den Färber (0,02 % Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 % Ethanol, 2 % ortho-Phosphorsäure (85 %), 5 %

Ammoniumsulfat $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) bzw. danach in den Entfärber (10 % Ethanol , 2 % Phosphorsäure (85 %)) gelegt.

Die Färberlösung enthält u.a. Coomassie Brilliant Blue G-250. Dabei handelt es sich um den Farbstoff Triphenylmethan, welcher sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert und somit unspezifisch Proteine anfärbt.

Nach dem Färbevorgang sind die einzelnen Proteine sichtbar und das Gel konnte gescannt werden. Jedoch wurde vom Ausschneiden entsprechender Spots aus diesem Gel abgesehen, da die Identifizierung der Proteine mittels Multiplex-2D-Gelelektrophorese stattfinden sollte.

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Da für die Durchführung der geplanten Multiplex-2D-Gelelektrophorese die Angabe über den genauen Proteingehalt der Urinproben nötig waren, wurde zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Bradford-Test benutzt, welcher eine schnelle und sensitive Methode darstellt.

Hierbei handelt es sich um ein photometrisches Verfahren, bei dem die Probe mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 versetzt wird. Dieser zeigt bei 465 nm sein typisches Absorptionsmaximum. Wird das Bradford-Reagenz (1 Teil Dye Reagent Concentrate, 4 Teile Aqua dest.) zur Probe hinzugegeben, bindet der Farbstoff unspezifisch an kationische und nicht polare, hydrophobe Seitenketten der Proteine und es erfolgt eine Komplexbildung. Durch diese Bindung wird das Absorptionsspektrum auf 595 nm verschoben. Die Zunahme der Absorption bei dieser Wellenlänge ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung, d.h. je stärker die Absorption bei dieser Wellenlänge ist, desto mehr Proteine enthält die Probe.

In der Praxis wurde dazu im Absorptionsspektrometer (Tecan Fluoreszenz- und Absorptionsspektrometer Magellan V.3.00) die optische Dichte bestimmt und mithilfe einer Eichkurve auf die Proteinkonzentrationen umgerechnet.

Die Eichgerade wurde anhand von Rinderserumalbumin (BSA, $c=1,54 \text{ mg/ml}$) in sechs verschiedenen Konzentrationen erstellt (s. Tab. 11).

Tabelle 11: Verdünnungen des BSA-Standards ($c=1,54 \text{ mg/ml}$) zur Erstellung der Eichgerade

BSA-Standard [μl]	Aqua dest. [μl]	angestrebte Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
0	25	0
2	58	0,051
2,5	47,5	0,077

3	42	0,103
5	45	0,154
10	40	0,308

Auf eine 96-Well-Platte wurden jeweils pro Well 10 µl von den Proben der Standardreihe und von den zu vermessenden Urinproben in Doppelbestimmung pipettiert. Die Urinproben wurden mit destilliertem Wasser in unterschiedlichen Verdünnungsstufen aufgetragen, sodass die Verdünnungskonzentration im linearen Bereich der Eichkurve lag. Anschließend wurden die Proben mit 200 µl Farbstoff versetzt. Dann folgte eine Inkubationszeit von 5 min auf dem Schüttler unter Lichtschutz und die Vermessung im Absorptionsspektrometer bei 595 nm.

3.2.4 Multiplex-2D-Gelelektrophorese

Bei der Multiplex-2D-Gelelektrophorese handelt es sich um ein Verfahren, welches die Identifizierung und die relative Quantifizierung von unterschiedlich exprimierten Proteinspots ermöglicht. Es kombiniert die Auftrennung mittels 2D-Gelelektrophorese mit der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, was den Vergleich von mehreren Proben im direkten Vergleich auf dem gleichen Gel ermöglicht. Dabei werden die Proben mit verschiedenen Cyanin-Farbstoffen, welche an Lysin binden, angefärbt. So können selbst schwach abundante Proteine von bis zu 30 pg detektiert und schon geringe Expressionsänderungen nachgewiesen werden. Zudem wird ein interner Standard generiert, durch dessen Verwendung der Vergleich von mehreren Gelen miteinander möglich ist.

Die Detektion der Proteinspots erfolgte mit Hilfe eines speziellen Laserscanner, wobei jeder Farbstoff mit unterschiedlichen Wellenlänge angeregt und sichtbar gemacht wird. Zur Auswertung wurde die Detektionssoftware Delta2D 4.2 genutzt.

Im folgenden Experiment wurden Urinproben von Patienten mit Rejektion und Patientenproben ohne Rejektion unterschiedlich markiert und aufgetrennt. Um die benötigte Proteinmenge für die Multiplex-2D-Gelelektrophorese zu erreichen, wurden blind jeweils neun Patientenproben der beiden Patientengruppen gepoolt (40 µg Gesamtprotein pro Probe). Die Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der Probenpools.

Tabelle 12: Zusammensetzung von POOL 1 (ohne Rejektion) und POOL 2 (mit Rejektion)

POOL 1				POOL 2			
ohne Rejektion				mit Rejektion			
Probe	Entnahme- tag (post-	Protein- konzent-	V mit 40µg	Probe	Entnahme- tag (post-	Protein- konzent-	V mit 40µg

	operativ)	tration [µg/ml]	Gesamt- protein [µl]		operativ)	tration [µg/ml]	Gesamt- protein [µl]
518	5	514,0	77,82	282	5	19596,0	2,04
748	5	164,75	242,79	337	5	930,56	42,96
1004	3	8364,0	4,78	1015	3	19296,0	2,07
1184	3	746,5	53,58	1646	3	3396,0	11,78
1393	3	1193,75	33,51	1683	3	1617,7	24,73
1448	3	281,75	141,97	1913	3	11148,0	3,59
1455	3	2061,25	19,41	1921	3	5336,0	7,50
1465	5	1915,75	20,88	1949	3	1481,6	27,0
1496	3	988,25	40,47	2118	3	1104,16	36,23
360 µg in 639,99 µl				360 µg in 157,9 µl			

Zudem wurde ein interner Standard mitgeführt, welcher zu gleichen Teilen aus beiden Probenpools bestand und damit alle aufgetragenen Proteine enthielt und als Kontrolle diente. Wegen der geringen Probenanzahl (< vier Proben bzw. Pools) wurden technische Replikate angefertigt, d.h. die Probenpools wurden jeweils mit beiden Farbstoffen markiert und gekreuzt auf die Gele gegeben. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die bei der Auswertung detektierten Unterschiede in der Expression bzw. im Proteinmuster nicht durch die unterschiedlichen Signalstärken der genutzten Farbstoffe herrühren, sondern dass es sich um tatsächliche Expressionsunterschiede handelt.

3.2.4.1 Fällung der Urinproteine mit 75% Acetonitril

Es wurde eine Fällung mit Acetonitril 75% durchgeführt, weil bei der Verwendung von Urinen damit besonders gute Ergebnisse erzielt werden können.

Die gepoolten Proben der beiden Gruppen sowie der mitgeführte Standard wurden zunächst gemischt und für 1 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die beiden Proben mit dem jeweils dreifachen Probenvolumen eiskaltem Acetonitril versetzt, gemischt und für 10 min bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, sodass die Proteine ausfallen konnten. Dann erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (12.000 x g bei 4 °C für 5 min). Der Überstand wurde abgenommen und das gefällte Proteinpellet luftgetrocknet. Die Proben wurden dann jeweils in 36 µl Lysepuffer (pH 8,5; 8 M Urea, 2M Thiourea, 30mM Tris, 4% CHAPS) aufgenommen und die Gesamtproteinkonzentration mit der Bradford-Methode bestimmt.

3.2.4.2 Markierung mit G-Dyes (^{NH}Dyagnostics)

Bei den G-Dye-Hochleistungsfarbstoffen handelte es sich um stark fluoreszierende und fotostabile Farbstoffe zur Proteinmarkierung. Sie verfügen über einen aktivierten NHS-Ester, wodurch die Ausbildung einer kovalenten Bindung an ein Lysinrest möglich ist.

Es wurden die Farbstoffe G-Dye200 (rot) und G-Dye300 (blau) für das Markieren der Proben verwendet, während G-Dye100 (gelb) zum Markieren des internen Standards verwendet wurde. Um die Probe effizient zu markieren, sollten Proteine und G-Dye im Volumenverhältnis von 10:1 stehen.

Zunächst wurde der Farbstoff in der geeigneten Konzentration hergestellt. Dazu wurden die drei Farbstoffe aus dem Refraction-2D™ Labeling Kit auf Raumtemperatur gebracht und danach kurz zentrifugiert. 1 nmol jedes G-Dye wurde dann in jeweils 2,5 µl G-Dye-Solvent (DMF) gelöst, um die finale Konzentration von 400 pmol/µl zu erhalten, kurz gemischt und wiederum zentrifugiert.

Zur Markierung wurde die genaue Proteinkonzentration der zu färbenden Proben mittels Bradford-Assay bestimmt (Ergebnis siehe Abschnitt 4.3, Tabelle 35 und 36), um 50 µg Gesamtprotein jedes Probenpools bzw. des internen Standards mit dem jeweiligen Farbstoff zu markieren.

Das zur Markierung benötigte Probenvolumen wurde in ein neues Tube gegeben und mit 2D-Lysepuffer auf 10 µl aufgefüllt, dann kurz gemischt und anschließend zentrifugiert.

Zu jeden 10 µl der mit Lysepuffer aufgefüllten Probe wurden je 1 µl Dye hinzugegeben. Das genaue Vorgehen ist in Tabelle 13 nachzuvollziehen.

Tabelle 13: Schema zur Markierung der Proben mit den G-Dyes (^{NH}Dyagnostics)-Farbstoffen

Gefäß-Nr.	Pool	Proteinmenge [µg]	V Probe [µl]	V Lyse-puffer [µl]	V G-Dye [µl]
1	ohne R	50	8,5	1,5	1µl G-Dye 200
2	ohne R	50	8,5	1,5	1µl G-Dye 300
3	mit R	50	6,4	3,6	1µl G-Dye 200
4	mit R	50	6,4	3,6	1µl G-Dye 300
5	ohne R + mit R (interner Standard)	100	8,5 + 6,4	5,1	2µl G-Dye 100

Die Proben wurden für 30 min auf Eis gestellt und unter Lichtschutz inkubiert. Danach wurde 1 µl G-Dye Stopplösung (10 mM Lysin) zugegeben, um die freien Farbstoffmoleküle zu binden. Die Proben wurden kurz gemischt sowie zentrifugiert und wiederum für 10 min auf Eis und im Dunklen inkubiert. Als nächster Schritt folgte die Rehydatisierung.

3.2.4.3 Rehydrierung

Hierbei wird der IPG-Streifen, welcher ein immobilisiertes pH-Gradientengel darstellt und in dehydrierter Form käuflich zu erwerben ist, in geeignetem Puffer rehydriert. Die Probe wird dazu vorher in diesen Rehydrierungspuffer aufgenommen.

Bei diesem Versuch sollten letztendlich zwei Gele entstehen, welche jeweils den Standard und die gekreuzt gefärbten Probenpools enthalten. Welche Kombination der Proben auf die IPG-Streifen und schließlich auf den Maxi-Gele gegeben wurden, ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Experimentelles Design für die Multiplex-2D-Gelelektrophorese

	Gel 1	Gel 2
G-Dye 100	Interner Standard	Interner Standard
G-Dye 200	Pool ohne Rejektion (Tube 1)	Pool mit Rejektion (Tube 3)
G-Dye 300	Pool mit Rejektion (Tube 4)	Pool ohne Rejektion (Tube 2)

Die Rehydratisierungskammer wurde zunächst waagrecht platziert und austariert, damit die Proben sich während der Rehydratisierung gleichmäßig verteilen können. Anschließend wurde der Rehydrierungspuffer (5 ml-Aliquot; 8 M Urea, 2% Chaps, Bromphenolblau) aufgetaut und mit 18 mM DTT sowie 2% IPG-Puffer versetzt. Zu der Probe wurde ein bestimmtes Volumen an Rehydrierungspuffer gegeben, welche sich aus dem Rehydrierungsvolumen von 340 µl minus dem zugegebenen Probenvolumen ergibt. Anschließend wurden diese 340 µl in eine Spur der Kammer luftblasenfrei pipettiert. Mit der nach unten zeigenden Gelseite wurde der IPG-Streifen (18cm, pH 3-10) in die vorbereitete Spur gelegt und abschließend mit 1,5 ml DryStrip CoverFluid überschichtet, um die Proben vor einer möglichen Verdunstung und den Harnstoff vor einem Auskristallisieren bei Einfluss von Luftsauerstoff zu bewahren. Die Kammer wurde luft- und lichtgeschützt verschlossen und die Proben für 20 Stunden inkubiert. Die Rehydrierung erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.

3.2.4.4 **Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung**

In dieser ersten Phase werden die aufgetragenen Proteine in einem immobilisierten pH-Gradientengel durch Anschließen eines elektrischen Feldes 1-dimensional entsprechend ihres isoelektrischen Punkts aufgetrennt. Der experimentelle Ablauf wird im Folgenden erklärt.

Nach der beendeten Rehydratisierung wurde der IPG-Streifen abgetropft und anschließend in den Ettan™ IPGphor™ 3, der mit ca. 110 ml DryStrip CoverFluid gleichmäßig befüllt wurde, entsprechend der Streifenlänge und Polung platziert. Die Elektrodenfilter wurden mit 150 µl Aqua dest. befeuchtet und so platziert, dass sie ca. 3 mm auf dem Gel auflagen. Die Elektroden mussten gerade und ohne Kontakt zum Gel-Streifen angelegt werden, denn die genaue Platzierung ist Voraussetzung für einen durchgängigen Stromfluss und für die optimale Auftrennung. Nach dieser Vorbereitung wurde in der zugehörigen Ettan™

IPGphor™ 3 Control Software 1.1 ein passendes Protokoll für die Anzahl, Länge und den pH-Bereich der IPG-Streifen ausgewählt und die erste Dimension gestartet.

Der folgenden Tabelle 15 können die Parameter des angewendeten Protokolls entnommen werden.

Tabelle 15: Laufprotokoll der 1. Dimension für IPG Streifen 18cm, pH 3-10

IPG-Streifen	Schritte	Zeit [kVh]
18cm pH 3-10	1. Step and Hold	0,5
	2. Gradient	0,8
	3. Gradient	16,5
	4. Step and Hold	6,2

3.2.4.5 Equilibrierung

Die Equilibrierung, welche sich an die elektrophoretische Auftrennung anschließt, dient der Spaltung von Disulfidbrücken innerhalb der Proteine und der Negativbeladung mit Natriumdodecylsulfat (SDS). Im ersten Schritt werden die Disulfidbrücken mit Dithiothreitol (DTT) reduziert, im zweiten Schritt wird die Reoxidation der aufgetrennten Brücken durch die Alkylierung mit Iodacetamid (IAA) verhindert. Das SDS ist ein negativ geladenes Detergens, welches zur völligen Entfaltung, der sog. Linearisierung, der Proteine führt. Das ist insofern wichtig, da die Proteine im nächsten Schritt nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden und das Durchwandern des Polyacrylamid-Gels nur korrekt möglich ist, wenn sie in ihrer voll entfalteten Molekülgröße und mit negativer Ladung vorliegen. Erst dann können sie beim Anlegen von Strom korrekt von der Kathode zur Anode zu wandern.

Die Durchführung der Equilibrierung lief folgendermaßen ab:

Vor der Anwendung wurden dem Equilibrierungspuffer (6 M Urea, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 30 % Glycerol (99,5 %), 2 % SDS, 0,002 % Bromphenolblau) 32 mM DTT für den Puffer I und 243 mM IAA dem Puffer II zugesetzt. Beide wurden gemischt, bis sich alles gelöst hatte und bis zur Verwendung lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt. Die IPG-Streifen wurden nach Beendigung der 1. Dimension aus dem Gerät entnommen, abgetropft und anschließend mit der Gelseite nach oben in das Equilibrierungsröhrchen mit dem Puffer I gelegt. Dann wurden sie für 15 min auf dem Schüttler platziert, sodass der gesamte Streifen mit Equilibrierungspuffer überzogen wurde. Anschließend wurde der Schritt in derselben Art und Weise mit dem Puffer II wiederholt.

3.2.4.6 Zweite Dimension – SDS-PAGE

In diesem Schritt erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Dazu wurde der Gelstreifen, auf dem die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt vorliegen, auf ein Polyacrylamid-Gel gelegt. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die durch die Ankopplung von SDS negativ-geladenen Proteine durch das Gel, bis sie durch ihre unterschiedliche Molekülgröße abgebremst werden und entsprechend ihrer Größe an dieser bestimmten Stelle im Gel liegen bleiben.

Im Experiment wurden zunächst die Maxi-Gele (12,5 %; 1,5 M Tris (pH 8,8), Acrylamidlösung (30 %), 10 % APS, TEMED, HPCL) in die Elektrophoresekammer Ettan™ DALTsix™ platziert und die untere Kammer mit drei Litern 2fach-SDS-Puffer befüllt. Anschließend wurde das Thermostat, die Pumpe sowie die Kammer eingeschaltet, sodass der Puffer zirkulierte und auf 16 bis 18 °C gekühlt wurde.

Die beiden IPG-Streifen wurden auf dem jeweiligen 12,5%igen SDS-Gel positioniert. Mit Hilfe eines Filterpapiers konnte außerdem 15 µl des Fluoreszenzmarker aufgetragen werden, mit dessen Hilfe später das Zuordnen der Spots zu ihrem Molekulargewicht möglich war. Um die IPG-Streifen und das Filterpapier in Position zu halten, wurden diese mit 0,5 %iger, mit einer Spatelspitze Bromphenolblau versetzter Agarose überschichtet. Dann wurde die obere Pufferkammer gerade aufgesetzt und mit ca. 800 ml 2fach-SDS-Puffer befüllt, bis der Flüssigkeitsspiegel zwischen dem Minimum- und Maximumfüllstand lag und in beiden Kammern ausgeglichen waren.

Bei den Laufbedingungen mit EPS601 ist vor allem darauf zu achten, dass eine konstante Spannung von 80 V anliegt und Lichtschutz gegeben ist.

Die Detektion der Spots erfolgte mithilfe des Typhoon Scanners 9410 und die Auswertung der Gele mit der Software Delta2D 4.2 .

3.2.4.7 Scannen der Gele

Die Auswertung der angefertigten Gele erfolgte in freundlicher Kooperation mit dem Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut Jena. Es wurde der GE Healthcare Typhoon 9410-Scanner benutzt, bei dem sowohl die Wellenlänge des Anregungslichtes als auch die Filteroptik für das Emissionslicht der Fluoreszenzfarbstoffe angepasst werden kann. Die drei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit Hilfe verschiedener Wellenlängen (Tabelle 16) zur Emission angeregt, separat voneinander detektiert und in einem gemeinsamen Gelbild dargestellt und gespeichert.

Zunächst erfolgte ein Vor-Scan mit geringer Auflösung (1000 μm) zur Anpassung der Detektorspannung. Damit wurde vermieden, dass Proteinspots oberhalb der Sättigungsgrenze liegen und den Hintergrund wurde so gering wie möglich gehalten. Die Aufnahmequalität wurde anschließend mit dem Bearbeitungsprogramm Image Quant™ überprüft. Danach erfolgte der eigentlich Scan-Vorgang in hoher Auflösung (100 μm).

Tabelle 16: genutzter Kanal (Wellenlänge) und erzeugte Emissionen in nm

G-Dye	Anregungsmaximum in [nm]	Emissionsmaximum in [nm]
G-Dye100 (Standard)	420	488
G-Dye200	532	580
G-Dye300	633	670

3.2.4.8 Auswertung mit Software Delta 2D 4.2

Mit Hilfe der Software Delta2D 4.2 wurden nun die gescannten Gele ausgewertet. In der Analysesoftware wurden vom Originalbild der Hintergrund und Artefakte abgezogen, sodass dann das Proteinspotmuster besser ausgewertet werden konnte. Mit dem sog. „Warping“ war es schon vor der Spotdetektion und der Quantifizierung möglich, eventuelle Laufunterschiede der Gele auszugleichen. Dafür wurden zunächst in allen Gelbildern die einander entsprechenden Spots automatisch und/oder manuell zugeordnet. Durch diese Positionskorrektur der Spots und die Kennzeichnung einander entsprechender Spots in den verschiedenen Gelen, konnten die Gele ideal aufeinander gelegt werden. Mit diesen gewarpten Bildern wurde dann in der Dual-Channel-Ansicht eine qualitative Analyse der Spots durchgeführt.

Nach diesem manuellen Markieren aller in den Gelen vorhandenen Spots wurde ein sog. Fusionsbild erstellt. Dieses Bild stellt eine Vereinigung aller Gele dar. Da alle Proben über den mitgeführten internen Standard abgeglichen sind, ist über die Relation auch eine Quantifizierung möglich. Werden also die Standardproben der verschiedenen Gele gegeneinander verglichen, sind auch alle Proben aus den verschiedenen Gelbildern miteinander vergleichbar.

Die Detektion der Spots erfolgte auf dem Fusionsbild, wobei für diesen Versuch die Kriterien festgelegt wurden, dass etwa 20 % Sensitivität in Bezug auf den Hintergrund und ein mittlerer Spotdurchmesser von 28 Pixel vorliegen muss. Automatisch detektierte Spots wurden manuell korrigiert, d.h. fusioniert oder getrennt bzw. zusätzlich detektiert. Das somit entstandene

Spotmuster des Fusionsbildes wurde nun wieder auf die einzelnen Gelbilder projiziert. Nun war ein Vergleich dieses vorgegebene Muster in den einzelnen Gelen möglich und es konnten Unterschiede in der Expression einzelner Proteinspots festgestellt werden.

Mit der Software wurden verschiedene statistische Analysen durchgeführt, um signifikante Unterschiede in der Proteinexpression der beiden untersuchten Patientengruppen zu ermitteln. Diese Proteinspots wurden in den Gelbildern markiert, um sie zur anschließenden massenspektrometrischen Identifizierung aus dem Gel zu isolieren.

3.2.4.9 Färben des Gels mit Coomassie Brilliant Blau G 250 und anschließendes Picken der Proteinspots

Um die Proteine zu picken, wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blau G-250 gefärbt. Die Gele wurden für das Färben zunächst mit Aqua dest. gewaschen. Nach der Fixierung über Nacht wurden die Gele zweimal für 15 min mit Aqua dest. gewaschen. Zur Stocklösung Coomassie Brilliant Blau G-250, welche am Vortag hergestellt wurde, wurden ein Volumenteil Methanol zugegeben und die Gele wurden in dieser Färbelösung über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie mit 1%iger Essigsäure entfärbt, bis der Hintergrund des Gels klar war. Abschließend wurden die Gele noch mit Aqua dest. gespült.

3.2.5 Tryptischer Verdau ausgewählter Proteinspots

Ein In-Gel-Verdau ermöglicht die Identifizierung der detektierten Proteinspots aus der Multiplex-2D-Gelelektrophorese. Die enzymatische Spaltung erfolgte mit Hilfe der Serinprotease Trypsin. Diese hydrolysiert spezifisch die Peptidbindungen C-terminal der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. So entsteht eine definierte Anzahl an Peptidfragmenten mit charakteristischen Massen. Anhand der Pickkarte sollten die markierten Spots ausgeschnitten und in 0,5 ml-Protein LoBind® Tubes mit 100 µl A. dest. überführt werden.

Alle von der Software als signifikant unterschiedlich exprimiert detektierten und im Gel wieder aufgefundenen Proteinspots wurden in der Größe von 1 x 1 mm mit einer Pipettenspitze aus dem Coomassie Brilliant Blau G-250-gefärbten Gel gepickt, tryptisch verdaut und anschließend mittels Peptide Mass Fingerprintng (PMF) identifiziert.

3.2.5.1 Durchführung des Tryptischen Verdaus

Zunächst wurden die gepickten Spots in je 500 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat/Acetonitril (1:2) für 15 min gewaschen. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und erneut 100 µl

Acetonitril dazugegeben, so dass die Gelstücke schrumpften, und wiederum die Flüssigkeit abgenommen. Im nächsten Schritt wurde 100 µl des 50 mM NH_4HCO_3 dazugegeben und 5 min geschüttelt, anschließend 100 µl Acetonitril hinzugegeben und für 15 min gemischt. Daraufhin wurden die Spots noch einmal mit Acetonitril bedeckt, um die Gelstücke weiter zu verkleinern. Nachdem die Flüssigkeit abgenommen wurde, trockneten die Proteinspots für 5 min in einer Vakuumzentrifuge. Für den tryptischen Verdau wurden 20 µl Trypsinlösung (10 ng/µl; Sequencing Grade Modified Trypsin (V511A Promega), 25 mM NH_4HCO_3) zu jedem Spot gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nicht in die Gelstücken diffundierte Lösung wurde entfernt. Nach der Zugabe von 2 bis 3 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat erfolgte über Nacht der Verdau bei 37 °C im Wärmeofen.

Am nächsten Tag wurden die Peptide mit 10 µl Extraktionslösung (zwei Teile Acetonitril, ein Teil 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)) für 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen wurden die Peptidextrakte in frische Reaktionsgefäße überführt und bis zur MALDI-TOF-MS-Analyse bei - 20 °C gelagert.

3.2.6 Peptid Mass Fingerprinting (MALDI-TOF-MS und Datenbank-Analyse)

Die Massenspektrometrie ist eine Technik zur Bestimmung von Molekülmassen von Ionen im Hochvakuum. Die Matrix-Präparation wurde 1988 von Franz Hillenkamp und Michael Karas entwickelt und wird heute noch für die Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) genutzt. Die Probenmoleküle werden dabei in ein Matrix-Kristallgitter eingehüllt, im Massenspektrometer mit einem Laser ionisiert und im Vakuum beschleunigt, sodass nach dem Auftreffen der Moleküle auf einem Detektor die Flugzeit (TOF) analysiert werden kann.

3.2.6.1 Durchführung

Dazu wurde jeweils 1 µl Probe mit 1 µl HCCA-Matrix (10 mg/ml HCCA in 50 % ACN und 50 % Aqua), welche mit 0,1% TFA und 7 mM NTA versetzt wurde, auf einen MTP AnchorChip-Target 800/384 (Bruker Daltronics) gespottet und luftgetrocknet. Durch das Verdampfen des Lösungsmittels kam es zur Kokristallisation von Matrix und Peptiden (Analyt). Die Messung erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit mit dem Leibniz Instituts für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut Jena, Abteilung für Molekulare und Angewandte Mikrobiologie in dem Bruker Daltonics ultrafleXtreme™ MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer. Die Messung wurde mit der Software

flexControl 3.3 (Bruker Daltonics) durchgeführt. Die Verarbeitung der Spektren erfolgte in der Software flexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics).

3.2.6.2 Vermessung im Bruker Daltonics Ultraflex Massenspektrometer

Im Hochvakuum des Massenspektrometers wurde der Matrix/Anylat-Kokristallit mit gepulstem Laser beschossen. Wie bei der SELDI-TOF-MS kommt es durch den Laserbeschuss zur Desorption und zur Ionisation der Moleküle von Analyt und Matrix. Anschließend werden diese erzeugte Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und erhalten somit kinetische Energie, welche abhängig von Masse und Ladung ist, sowie die Grundlage für die TOF-MS darstellt. Durch die Beschleunigung werden die gleich geladenen Teilchen entsprechend des Masse-Ladungs-Verhältnisses, welches proportional zum Quadrat der Flugzeit ist, beschleunigt. Entsprechend ihrer Flugzeit kann dann auf die Masse des Analytes geschlossen werden.

Mit Hilfe des Detektors wurden die auftreffenden Ionen als Signale registriert und es erfolgte eine Umwandlung in ein auswertbares Spektrum, welches Informationen über das Masse/Ladungsverhältnis und die Intensität gibt. Da es sich bei unseren Proben um tryptische Spaltprodukte mit charakteristischen Massen für jedes Protein handelte, lieferte die massenspektrometrische Analyse einen „Fingerabdruck“ des verdauten Kandidatenproteins, den sog. Peptide Mass Fingerprint (PMF).

3.2.6.3 Datenbankanalyse mit MASCOT

Zur Identifizierung der verdauten Proteine wurden die ermittelten Fingerprints in die Software ProteinScape 2.1 importiert und über die Suchmaschine Mascot 2.3 einem Abgleich mit der Proteindatenbank NCBIInr unterzogen. Dabei wurden ± 50 ppm Peptidtoleranz zugelassen und Methionin-Oxidation als variable Modifikation eingestellt. Diese Datenbank lieferte eine Übersicht von Proteinkandidaten mit deren Molekulargewichte, dem theoretischen pI und den jeweiligen Sequenzübereinstimmungen (Peptidzahl). Außerdem wurde ein so genannter Mascot-Score angegeben, der bei humanen Proteinen über 67 liegen sollte. Wurde dieser überschritten, konnte davon ausgegangen werden, dass das Protein richtig identifiziert wurde.

3.2.7 Western Blot

Um die ermittelten Kandidatenproteine des Peptide Mass Fingerprinting (PMF) zu überprüfen, wurden Wester Blots von 2D-PAGE-Gelen durchgeführt. Dadurch erfolgt ein

Nachweis für das Vorhandensein der Proteine in den Proben und deren Lokalisation im analytischen Multiplex-2D-Fluoreszenzgel.

3.2.7.1 Durchführung

Ein Pool aus Urinen von Patienten mit und ohne Rejektion wurde in zwei Gelen nach dem unter Abschnitt 3.2.2.4 beschriebenen Protokoll in einer 2D-PAGE aufgetrennt. Dabei wurden 15 µg Gesamtprotein für jedes Gel verwendet. Nach einer Coomassie Brilliant Blue G-250-Färbung (siehe Abschnitt 3.2.2.5) wurden die Gele zum späteren Abgleich mit den Blot-Mustern gescannt. Die Proteine wurden in einem Wet-Tank-Verfahren mit Transferpuffer (192 mM Glycin, 48 mM Tris, 20% Methanol; pH 8,5) auf PVDF-Membranen mit einem Durchmesser von 0,45 µm geblottet (170 mA/Gel, 40 min).

Der ebenfalls geblottete Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 wurde durch kurzes Spülen mit 100 %igem Methanol entfernt. Daraufhin folgte die Blockierung der Membran mit 1 % BSA in TBS-Puffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl; pH 7,6). Nun wurde die Membran zweimal für jeweils 10 min mit TBS-Tween (pH 7,6; TBS-Puffer mit Zusatz von 0,1% Tween20) und einmal für 10 min in TBS gewaschen. Die Inkubation der Membranen erfolgte über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper. Für Alpha-1-Antitrypsin wurde ein monoklonaler Maus-Anti-Alpha-1-Antitrypsin-Antikörper ([ab9400] von Abcam, Cambridge, UK) in einer 1:3.000-Verdünnung in TBS-Puffer verwendet. Zur Detektion von Haptoglobin wurde ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Haptoglobin-Antikörper ([ab97976] von Abcam, Cambridge, UK) in einer 1:8.000-Verdünnung in TBS-Puffer eingesetzt. Daraufhin wurden die Membranen, wie beschrieben, gewaschen und mit dem entsprechenden Alkalische Phosphatase (AP)- konjugierten Sekundärantikörpern (Huhn-Anti-Maus-IgG [sc-2958] und Rind Anti-Kaninchen-IgG [sc-2372], beide von Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) in einer 1:10.000-Verdünnung in TBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Nach wiederholtem Waschen erfolgte die Visualisierung mit BCIP-Lösung (5 % BCIP in DMF) und NBT-Lösung (5 % NBT in 70 % DMF), welche das Substrat für die AP darstellen. Die Membran wurde darin solange inkubiert, bis blau-violette Proteinspots sichtbar wurden. Um die Farbreaktion zu stoppen, wurden die Membranen mit Aqua dest. gespült und nach dem Trocknen gescannt.

3.2.8 Quantitative Analyse eines Kandidatenproteins mittels ELISA

Bei einem Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) handelt es sich um ein antikörper-

basiertes Verfahren zur quantitativen Bestimmung eines spezifischen Proteins in einer Probe. Es zählt zu den Immunassay-Verfahren, wobei es auf einem enzymatischen Farbumschlag und dessen Messung basiert. Es wurde 1971 zeitgleich von zwei Arbeitsgruppen entwickelt.

Mit Hilfe eines speziell für das nachzuweisende Protein hergestellte, käuflich erworbenen Kit erfolgte der Nachweis von Alpha-1-Antitrypsin in den Urinen. Durch oberflächengebundenen Primärantikörper (Coating-Antikörper, immobilisiert antibody) wurde das Protein Alpha-1-Antitrypsin spezifisch an einem Epitop gebunden. Daraufhin erfolgte die Zugabe eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper (Detektions-Antikörper, Biotinylated polykonal antibodies specific for Alpha-1-Antitrypsin), welcher spezifisch an den immobilisierten Primärantikörper bindet.

Es entsteht somit ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Die jeweiligen Epitope, an denen die beiden Antikörper binden, liegen dabei so, dass keine gegenseitige Behinderung entsteht.

Danach erfolgte die Zugabe des Streptavidin-Peroxidase-Komplex, wobei das Streptavidin sich hochaffin an Biotin bindet. Das kann sowohl in einem Einzelschritt geschehen oder aber der Komplex ist bereits an dem mit Biotin markierten Anti-Antikörper gebunden und wird so gemeinsam mit dem Detektions-Antikörper zum Probenmaterial gegeben. Wird nun ein Farbstoff hinzugegeben, welcher ein Substrat der Peroxidase ist, kommt es zu einer enzymatischen Reaktion und in diesem Fall zu einem Farbumschlag, welcher photometrisch messbar ist. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Proteinkonzentration, wodurch eine quantitative Ermittlung des Kandidatenproteins in jeder Patientenprobe möglich wird.

3.2.8.1 Durchführung

Zunächst wurden von der Standard-Proteinlösung und den Patientenproben Verdünnungen für das Assay vorbereitet. Dabei sollten die Urinproben zunächst für 10 min bei 600 x g zentrifugiert werden und anschließend wurde eine Verdünnung (1:20) im mitgelieferten Diluent hergestellt, mit welcher weitergearbeitet wurde.

Der mitgelieferte Standard wurde nach dem in Tabelle 17 dargestellten Schema verdünnt.

Tabelle 17: Verdünnungen des Alpha-1-Antitrypsin-Standards (100 ng/ml) zur Erstellung der Eichgerade

Verdünnung des Standard	Herstellung der Verdünnung	angestrebte Konzentration [ng/ml]
S1	Standard	100,00
S2	1 Teil S1 + 3 Teile Diluent	25,00
S3	1 Teil S2 + 3 Teile Diluent	6,25

S4	1 Teil S3 + 3 Teile Diluent	1,56
S5	1 Teil S4 + 3 Teile Diluent	0,39
S6	Diluent	0,00

Jeweils 50 µl der Proben der Standardreihe wurde dreifach und je 50 µl der Urinproben in einer zweifachen Bestimmung auf die mitgelieferte, mit immobilisierten Antikörpern bestückte 96-Well-Platte aufgetragen und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Mikroplatte fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Nun wurde je Well 50 µl des Biotin-gekoppelten Primärantikörper gegen das humane Alpha-1-Antitrypsin aufgetragen und für eine Stunde inkubiert, woraufhin wieder ein Waschriff folgte, der viermal wiederholt wurde. Bei diesem Kit war der Streptavidin-Peroxidase-Komplex schon an den mit Biotin markierten Anti-Antikörper gebunden, so dass im nächsten Schritt in jede Vertiefung 50 µl des Streptavidin-Peroxidase-Konjugates hinzugegeben und wiederum für 30 min inkubiert wurde. Auch auf diesen Schritt folgte ein fünfmal durchzuführender Waschriff, damit alle nicht-gebundenen Anti-Antikörper entfernt wurden. Nun wurde 50 µl des Farbstoffs (Chromogen Substrate Tetramethylbenzidin) in jedes Well gegeben. Dabei handelt es sich um ein Substrat der Peroxidase. Bei dessen Zugabe kam es zu einer enzymatischen Reaktion, welche einen Farbumschlag bewirkte. Sobald ein intensives Blau erreicht war, wurde die Farbreaktion mit 50 µl der Stopplösung beendet, wodurch es zu einem Farbumschlag zu gelb kommt. Umgehend erfolgte dann die photometrische Messung der Farbintensität bei 450nm in einem Fluoreszenz- und Absorptionsspektrometer.

Die Analyse der Werte erfolgte mit der Software Magellan V.3.00 . Mit Hilfe der Messung der Standard-Verdünnungen, welche in einer Dreifachbestimmung erfolgt war, ließ sich eine Standardkurve konstruieren. Durch einen Abgleich mit dieser Kurve konnte auf die unbekannten Konzentration von Alpha-1-Antitrypsin in den Urinproben geschlossen werden. Die kleinste detektierbare AAT-Konzentration wird von der Firma mit 0,39 ng/ml angegeben.

3.2.8.2 statistische Auswertung mittels SPSS 19.0

Nach dieser photometrischen Messung erfolgte eine Auswertung mit Hilfe der Software SPSS 19.0 . Es wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, welcher anzeigt, ob bezüglich der Konzentration des Proteins Alpha-1-Antitrypsin ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Patientengruppen vorliegt. Außerdem wurden Mittelwerte und die Standardabweichung für die Patientengruppen errechnet. Mit Hilfe einer ROC-Kurve wurde anschließend ein Cut-off-Wert festgelegt, mit dessen Hilfe eine Vorhersage bezüglich der Gruppenzugehörigkeit getroffen werden konnte. Hierzu wurden die Vorhersagewerte berechnet. Außerdem erfolgte mit Hilfe einer linearen Regression eine Untersuchung

bezüglich der Abhängigkeit der ermittelten Variable von anderen Einflussfaktoren, welche möglicherweise einen Expressionsunterschied des Kandidatenproteins bewirken könnten.

4 ERGEBNISSE

Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe einer Proteomanalyse Unterschiede in der Expression von Proteinen im Urin von Patienten mit und ohne Rejektion nach Nierentransplantation zu identifizieren. Dazu wurden verschiedene experimentelle Ansätze durchgeführt. Zunächst wurden mit Hilfe der SELDI-TOF-MS Expressionsmuster im Urin erhoben und anschließend bioinformatisch ausgewertet. Darauf folgte eine hochsensitive Analyse mittels Multiplex-2D-Gelelektrophorese. Ein relevantes Protein, welches bei der anschließenden MALDI-TOF-MS als unterschiedlich exprimiert detektiert wurde, konnte mittels Western Blot und ELISA validiert und quantifiziert werden. Im letzten Schritt erfolgte eine statistische Auswertung.

4.1 Identifizierung spezifischer Proteinmuster im Urin von Patienten mit und ohne Rejektion

4.1.1 Ermittlung von Proteinspektren der Urine mittels SELDI-TOF-MS

Zur Ermittlung der spezifischen Proteinexpression im Urin bei Patienten mit Rejektion wurde zunächst ein Trainingsset mit insgesamt 32 Urinproben zusammengestellt. Dieses Set setzte sich aus Proben von 16 Patienten mit gesicherter Rejektion und 16 Patienten ohne Rejektion zusammen. In der Abbildung 6 sind ermittelten Proteinspektren vom ProteinChip® Q10- und CM10-Array im Bereich LOW (0 – 20.000 Da) der Probe 300 beispielhaft dargestellt.

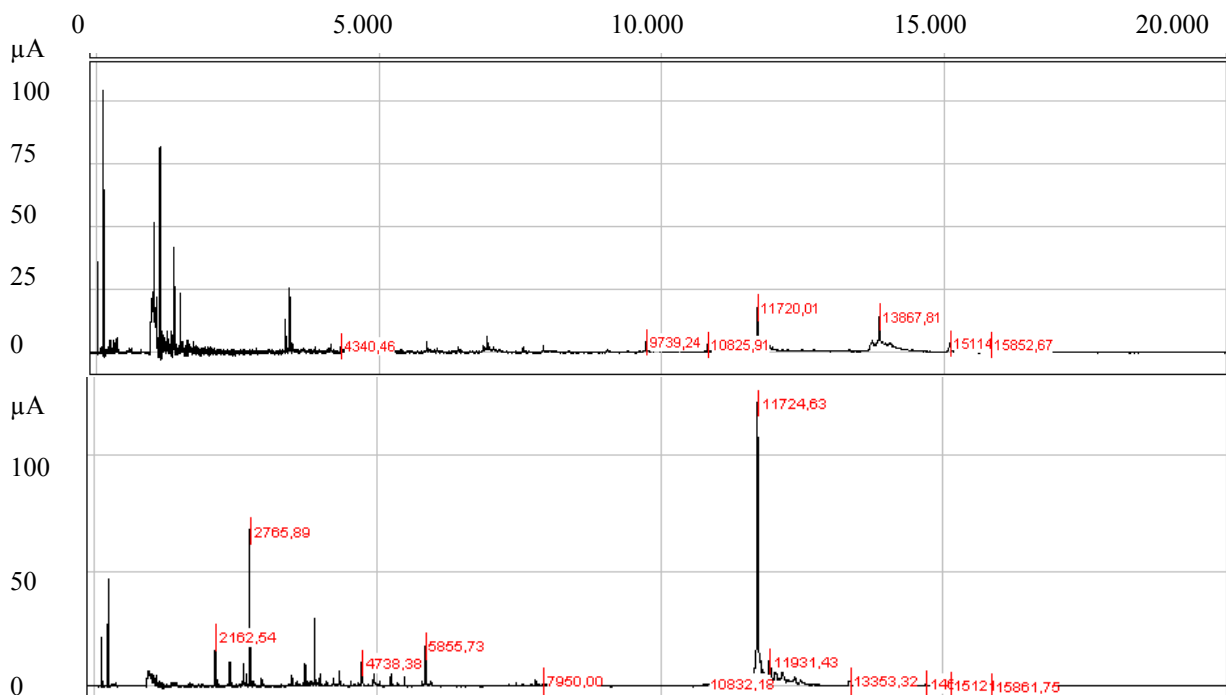


Abbildung 6: Proteinspektren der Probe 300 im Messbereich LOW: Q10-Chip (o.), CM10-Chip (u.)

Es wurde insgesamt deutlich, dass sich entsprechend des Auflösungsoptimums der SELDI-TOF-MS vor allem im niedermolekularen Bereich von 2.000 – 20.000 Da deutliche Proteinpeaks zeigten. Mit diesen Spektren erfolgte im Anschluss die weitere Auswertung, in dem diese verglichen und auf Grundlage von den ermittelten, unterschiedlich exprimierten Proteinen ein differenzielles Proteinmuster erstellt wurde.

4.1.2 Clusteranalyse und bioinformatische Ermittlung der Vorhersaggenauigkeit mit Hilfe der Software XL-Miner 3.5

Die mit dem Massenspektrometer ermittelten Proteinpeaks wurden aus der zugehörigen Software CiphergenExpress™ 3.0 für die weitere Auswertung in die Software XL-Miner 3.5 importiert. Die drei aufgenommenen Bereiche LOW, MIDDLE und HIGH wurden in einer Gesamtmatrix erfasst, so dass in der Übersicht die einzelnen Intensitäten aller Molekulargewichte den vermessenen Proben zugeordnet waren. Nach Logarithmierung und Erstellung eines Clusters konnten folgende 14 einkonditionelle Regeln für verschieden exprimierte Proteinkandidaten erstellt werden. Dabei wurde ein Signifikanzlevel von $\alpha = 0,8$ für das Trainingsset angewandt (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: einkonditionale Regelbasis bei Signifikanzlevel von $\alpha = 0,8$

einkonditionale Regel					Relevanzindex
IF	15.306 Da	HIGH (> 1.9585)	THEN	mit Rejektion	0,31418
IF	7.926 Da	LOW (< -11.4851)	THEN	ohne Rejektion	0,22817
IF	15.126 Da	HIGH (> 1.8437)	THEN	mit Rejektion	0,29979
IF	100.922 Da	LOW (< -3.0272)	THEN	ohne Rejektion	0,21188
IF	15.852 Da	HIGH (> 2.6311)	THEN	mit Rejektion	0,22555
IF	159.384 Da	LOW (< -3.3603)	THEN	ohne Rejektion	0,13939
IF	16.621 Da	HIGH (> 1.8823)	THEN	mit Rejektion	0,21929
IF	162.797 Da	LOW (< -4.5374)	THEN	ohne Rejektion	0,11778
IF	15.248 Da	HIGH (> 1.9289)	THEN	mit Rejektion	0,20497
IF	33.384 Da	LOW (< -0.32423)	THEN	ohne Rejektion	0,052737
IF	16.484 Da	HIGH (> 1.9477)	THEN	mit Rejektion	0,085436
IF	15.126 Da	LOW (< -2.163)	THEN	ohne Rejektion	0,0054191
IF	9.092 Da	HIGH (<-0.9542)	THEN	mit Rejektion	0,05811
IF	15.914 Da	LOW (> 2.7292)	THEN	ohne Rejektion	0,037613

Die daran erzeugte Heatmap (Abbildung 7) zeigt die Expressionsunterschiede der relevanten Proteine für die einzelnen Urinproben.

EINKONDITIONALE REGELN



Abbildung 7: Heatmap für das Trainingsset Urine: Jeder Probe sind in der Übersicht einzelne Regeln zugeordnet. *Proben in Zeilen, einkonditionale Regeln in Spalten; weiße Farbkodierung = 100 % Übereinstimmung, schwarze Kästchen = 100 % falsch. Graustufen entstehen durch die Clusterzuordnung des Algorithmus im Programm.*

Anschließend wurden einkonditionale Regeln mit hohen Relevanzindices kombiniert und eine vierkonditionale Regelbasis entworfen, welche als Modell zur Vorhersage von „mit Rejektion“ und „ohne Rejektion“ genutzt wurde. Diese ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Modell zur Vorhersage der Rejektion anhand von Urinen

Rule						Relevance Index
IF	15.306 Da HIGH	AND	15.126 Da HIGH	THEN	mit Rejektion	0,37108
	OR		OR			
	16.621 Da HIGH		16.484 Da HIGH			
IF	7.926 Da LOW	AND	7.926 Da LOW	THEN	ohne Rejektion	0,48836
	OR		OR			
	100.922 Da LOW		15.126 Da LOW			

Dieses am Trainingsset entwickelte Vorhersagemodell sollte auf seine Anwendbarkeit zur Vorhersage einer Rejektion geprüft werden. Hierfür wurde in der Software jeder einzelnen Patientenprobe anhand der in der vierkonditionellen Regel vorkommenden Proteinmassen eine Zugehörigkeit zur Gruppe „mit Rejektion“ oder zur Gruppe „ohne Rejektion“ zugeteilt. In der Tabelle 20 befindet sich eine Übersicht, ob die durch die Software getroffene Zuordnung zur jeweiligen Gruppe „korrekt“ oder „falsch“ war.

Tabelle 20: Ergebnisse des am Trainingsset angewendetes Vorhersagemodell

mit Rejektion			ohne Rejektion		
Probe	vorhergesagter Rejektionszustand mit/ohne	Zuordnung mittels Software korrekt/falsch	Probe	vorhergesagter Rejektionszustand mit/ohne	Zuordnung mittels Software korrekt/falsch
1	mit	korrekt	19	ohne	korrekt
3	mit	korrekt	20	ohne	korrekt
4	mit	korrekt	21	ohne	korrekt
5	mit	korrekt	24	ohne	korrekt
6	mit	korrekt	25	ohne	korrekt
7	mit	korrekt	26	ohne	korrekt
8	mit	korrekt	27	mit	falsch
9	mit	korrekt	28	ohne	korrekt
10	ohne	falsch	29	ohne	korrekt
11	mit	korrekt	30	ohne	korrekt
12	mit	korrekt	31	ohne	korrekt
13	mit	korrekt	32	ohne	korrekt
15	mit	korrekt	33	ohne	korrekt
16	mit	korrekt	34	ohne	korrekt
17	mit	korrekt	35	ohne	korrekt
20	mit	korrekt	36	ohne	korrekt

Durch das von der Software XL-Miner 3.5 generierte Vorhersagemodell war es möglich, 15 der 16 Patientenproben mit Rejektion richtig der Gruppe „mit Rejektion“ zuzuordnen. Bei den 16 Proben ohne Rejektion gab es ebenfalls nur eine Abweichung zwischen dem tatsächlichen und dem vorhergesagten Rejektionszustand.

Diese von der Software generierte Zuordnung wird dann manuell bezüglich des realen Rejektionszustandes überprüft und daraus die Sensitivität und Spezifität dieses Modells mittels der im Abschnitt 3.2.1.3 dargestellten Formel berechnet werden. Die Ergebnisse befinden sich in der unten stehenden Tabelle 21.

Tabelle 21: Sensitivität und Spezifität des Vorhersagemodells anhand des Trainingssets

Sensitivität	= (15/16)*100 = 93,75%
--------------	-------------------------------

Spezifität	= (15/16)*100 = 93,75%
------------	-------------------------------

4.1.3 Überprüfen der Anwendbarkeit des Vorhersagemodells an einem unabhängigen Testset

Es wurde ein Testset erstellt, welches aus je 16 Patientenproben mit Abstoßung und 16 Proben ohne Rejektion bestand. Die Proben waren bezüglich der Entnahmekriterien mit denen des Trainingssets identisch. Das erstellte Vorhersagemodell wurde auf diese Proben angewendet und wiederum die Korrektheit der Vorhersage überprüft. Da es sich um ein unabhängiges Testset handelt, kann so die Anwendbarkeit des Modells kontrolliert werden. Die Tabelle 22 enthält die Ergebnisse der Auswertung.

Tabelle 22: Auswertung der Anwendung des Vorhersagemodells am unabhängigen Testset

mit Rejektion			ohne Rejektion		
Probe	vorhergesagter Rejektionszustand mit/ohne	Zuordnung mittels Software korrekt/falsch	Probe	vorhergesagter Rejektionszustand mit/ohne	Zuordnung mittels Software korrekt/falsch
21	ohne	falsch	37	ohne	korrekt
22	ohne	falsch	38	ohne	korrekt
23	mit	korrekt	39	ohne	korrekt
24	mit	korrekt	40	ohne	korrekt
25	mit	korrekt	41	ohne	korrekt
26	ohne	falsch	42	ohne	korrekt
28	mit	korrekt	43	ohne	korrekt
29	mit	korrekt	44	ohne	korrekt
30	mit	korrekt	45	mit	falsch
31	mit	korrekt	46	ohne	korrekt
32	mit	korrekt	47	ohne	korrekt
33	mit	korrekt	48	ohne	korrekt
34	ohne	falsch	50	ohne	korrekt
35	mit	korrekt	51	ohne	korrekt
36	mit	korrekt	52	ohne	korrekt
37	mit	korrekt	53	mit	falsch

Durch Anwendung des Vorhersagemodells auf das Testset konnten 75,0 % der Patienten mit Rejektion korrekt erkannt werden. Die Spezifität betrug dabei 87,5 %.

4.1.4 Ermittlung der Vorhersagegenauigkeit anhand eines Testsets bestehend aus postoperativen Urinproben

Nun sollte anhand eines weiteren Testsets geprüft werden, ob eine Vorhersage mit Hilfe dieses Proteinmusters auch anhand von kurz nach der Transplantation entnommener Urinproben möglich ist.

Dazu wurde ein zweites Testset bestehend aus Proben, welche zwischen dem 1. – 10. postoperativen Tag gewonnen wurden und bei denen zu einem späteren Zeitpunkt eine Rejektion bioptisch gesichert wurde, benutzt. Mit der bisher genutzten Regel wurde eine Sensitivität von 57,7 % und Spezifität von 53,8 % in der Vorhersage der Rejektion ermittelt. Daraufhin wurden weitere Regeln hinsichtlich ihrer Vorhersagegenauigkeit überprüft. Das ausgewählte neue Modell ist in Tabelle 23 aufgeführt und unterscheidet sich im Relevanzindex nur geringfügig von dem zuvor genutzten Modell (Tabelle 19).

Tabelle 23: neues Modell zur Vorhersage der Rejektion

Rule						Relevance Index
IF	15.306 Da HIGH OR 16.621 Da HIGH	AND	15.126 Da HIGH OR 16.484 Da HIGH	THEN	mit Rejektion	0,37108
IF	100.922 Da LOW OR 159.384 Da LOW	AND	162.797 Da LOW OR 15.126 Da LOW	THEN	ohne Rejektion	0,44256

Für das Trainingsset ergeben sich auch mit dieser Regel nur unwesentliche Veränderungen in der Sensitivität. Sie beträgt nun 81,25% und die Spezifität unverändert 93,75%. Dabei wurde die gleiche Auswertung vorgenommen wie im Abschnitt 3.1.2 .

In der folgenden Tabelle 24 ist die Auswertung bezüglich der Rejektion mit Hilfe einer Vorhersage anhand der neuen Regel für das postoperative Testset zu finden.

Tabelle 24: Auswertung der Vorhersage durch die Anwendung des ermittelten Modells anhand eines Testsets, welches sich ausschließlich aus postoperativen Proben zusammensetzte

mit Rejektion			ohne Rejektion		
Probe	vorhergesagter Rejektionszustand mit/ohne	Zuordnung mittels Software korrekt/falsch	Probe	vorhergesagter Rejektionszustand mit/ohne	Zuordnung mittels Software korrekt/falsch
243	mit	korrekt	270	ohne	korrekt
252	mit	korrekt	413	ohne	korrekt
251	ohne	falsch	434	ohne	korrekt
275	ohne	falsch	518	ohne	korrekt

282	mit	korrekt	602	ohne	korrekt
300	ohne	falsch	722	ohne	korrekt
337	mit	korrekt	762	ohne	korrekt
389	ohne	falsch	784	ohne	korrekt
408	ohne	falsch	785	ohne	korrekt
426	ohne	falsch	805	mit	falsch
433	ohne	falsch	824	ohne	korrekt
437	ohne	falsch	847	ohne	korrekt
469	ohne	falsch	918	ohne	korrekt
476	mit	korrekt	947	ohne	korrekt
514	ohne	falsch	1004	mit	falsch
564	ohne	falsch	1137	ohne	korrekt
582	ohne	falsch	1184	ohne	korrekt
586	mit	korrekt	1213	ohne	korrekt
738	mit	korrekt	1230	ohne	korrekt
759	ohne	falsch	1231	ohne	korrekt
1015	mit	korrekt	1257	ohne	korrekt
1021	ohne	falsch	1261	ohne	korrekt
1092	ohne	falsch	1279	mit	falsch
1173	ohne	falsch	1308	ohne	korrekt
1186	ohne	falsch	1393	mit	falsch
1577	ohne	falsch	1398	ohne	korrekt

Nach Anwendung des Vorhersagemodells auf die postoperativen Proben von Patienten nach NTX, konnten nur 30 % der Patienten mit Rejektion mit Hilfe des Modells korrekt zugeordnet werden. Die Spezifität lag bei 84,6 %. Aufgrund der schlechten Sensitivität bei dieser Auswertung wurden die postoperativen Proben mit einer Rejektion noch einmal nach bestimmten Charakteristika wie Alter, Geschlecht sowie bezüglich des genauen Abstoßungszeitpunkt untersucht.

Bei der Auswertung fiel auf, dass vor allem die Rejektionen, welche eine große Zeitspanne zwischen Entnahmezzeitpunkt und Abstoßungszeitpunkt aufwiesen, mit dem benutzten Modell nicht korrekt vorhergesagt wurden.

Daher wurden eine Zeitspanne von ≤ 30 Tagen nach der Entnahme festgelegt und die Vorhersage mit der Regelbasis noch einmal wiederholt. In der Tabelle 25 befinden sich die zugehörigen Abstoßungszeitpunkte und Abstände zwischen Entnahme und Rejektionszeitpunkt sowie die Patientenproben, die aufgrund ihres zu großen Abstands zwischen Rejektion und Entnahmetag aus der Auswertung genommen wurden.

Tabelle 25: Entnahmezzeitpunkt und Zeitspanne zwischen Entnahme und Rejektion
grau-unterlegt = Proben, welche aufgrund ihrer langen Zeitspanne zwischen Entnahme und Abstoßung von der Auswertung ausgeschlossen wurden.

mit Rejektion					
Probe	Entnahme-	Zeitpunkt der	Abstand	vorhergesagter	Zuordnung

	Tag (post-operativ)	Abstoßung (postoperativ)		Rejektionszustand mit/ohne	mittels Software korrekt/falsch
243	9	30	21	mit	korrekt
252	9	18	9	mit	korrekt
251	9	420	411	ohne	falsch
275	9	91	82	ohne	falsch
282	5	9	4	mit	korrekt
300	9	83	74	ohne	falsch
337	5	12	7	mit	korrekt
389	9	33	24	ohne	falsch
408	9	97	88	ohne	falsch
426	5	36	31	ohne	falsch
433	9	16	7	ohne	falsch
437	9	60	51	ohne	falsch
469	5	47	42	ohne	falsch
476	7	97	90	mit	korrekt
514	9	37	28	ohne	falsch
564	9	13	4	ohne	falsch
582	9	11	2	ohne	falsch
586	10	23	13	mit	korrekt
738	1	n.a.	n.a.	mit	korrekt
759	9	n.a.	n.a.	ohne	falsch
1015	3	7	4	mit	korrekt
1021	4	n.a.	n.a.	ohne	falsch
1092*	9	60	51	ohne	falsch
1173*	9	60	51	ohne	falsch
1186*	9	96	87	ohne	falsch
1577*	9	150	141	ohne	falsch

Unter Beachtung dieser zeitlichen Einengung der Proben wurden erneut die Sensitivität und Spezifität des Vorhersagemodells für diese kurz nach der Transplantation entnommenen Patientenproben bestimmt, um die Möglichkeiten einer Vorhersage bezüglich der Rejektion mit Hilfe dieses festgelegten Proteinmusters einschätzen zu können (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Sensitivität und Spezifität des Vorhersagemodells anhand des postoperativen Testsets

Sensitivität	= (8/11)*100 = 72,73%
Spezifität	= (4/26)*100 = 84,60%

Wurden diese grau-unterlegten Proben aus der Auswertung genommen und eine Vorhersage auf bis zu 30 Tagen nach der Entnahme der Probe getroffen, so konnten bei 8 von 11 Proben die Rejektion schon wenige Tage nach der Transplantation mit Hilfe der aufgestellten Regel korrekt zugeordnet werden, was einer Sensitivität der Regelbasis von 72,73 % entspricht. Die Spezifität betrug unverändert 84,6 %.

4.1.5 Ermittlung eines spezifischen Expressionsmusters im Urin für postoperativ entnommene Proben

Es galt daraufhin zu überprüfen, ob das Vorhersagemodell noch exakter funktioniert, wenn das Trainingsset, anhand dessen das Modell erstellt wird, aus postoperativen Proben besteht. Daher wurde eine Untersuchung mittels XL-Miner 3.5 anhand von postoperativen Proben durchgeführt, bei denen bis zu 30 Tagen nach Probenentnahme eine Rejektion stattfand. Des Weiteren wurde ein unanhängiges Testset nach denselben Auswahlkriterien zusammengestellt, bestehend aus 14 Proben mit Rejektion und 14 Proben ohne Rejektion. Die Ergebnisse der Auswertung befinden sich in Tabelle 27 bis 29 sowie die Heatmap in Abbildung 8.

Tabelle 27: Modell zur Vorhersage der Rejektion anhand von postoperativen Urinen

Rule						Relevance Index
IF	2.773 Da HIGH	AND	10.849 Da LOW	THEN	ohne Rejektion	0,48735
	OR		OR			
	2.168 Da HIGH		93.359 Da LOW			
IF	2.773 Da LOW OR	AND	26.496 Da HIGH	THEN	mit Rejektion	0,38141
	2.168 Da LOW		OR			
			135.980 Da LOW			

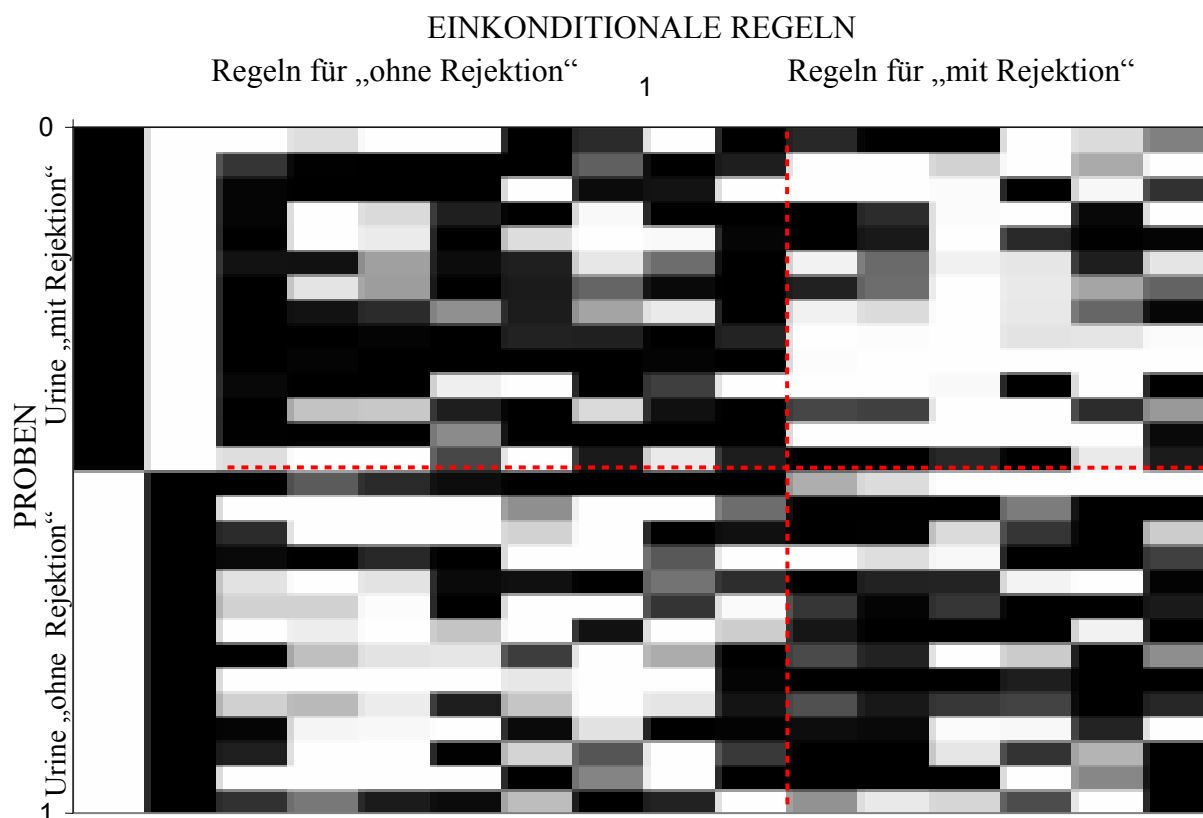


Abbildung 8: Heatmap für das postoperative Trainingsset

Tabelle 28: Auswertung des postoperativen Trainingssets

mit Rejektion			ohne Rejektion		
Probe	vorhergesagter Rejektionszustand mit/ohne	Zuordnung mittels Software korrekt/falsch	Probe	vorhergesagter Rejektionszustand mit/ohne	Zuordnung mittels Software korrekt/falsch
243	ohne	falsch	518	ohne	korrekt
252	mit	korrekt	602	ohne	korrekt
282	mit	korrekt	722	ohne	korrekt
337	mit	korrekt	762	ohne	korrekt
389	mit	korrekt	784	mit	falsch
433	mit	korrekt	785	ohne	korrekt
514	mit	korrekt	824	ohne	korrekt
564	mit	korrekt	847	ohne	korrekt
582	mit	korrekt	947	mit	falsch
586	mit	korrekt	1004	ohne	korrekt
738	mit	korrekt	1184	ohne	korrekt
759	ohne	falsch	1257	mit	falsch

1015	mit	korrekt	1261	ohne	korrekt
1021	mit	korrekt	1393	ohne	korrekt

Tabelle 29: Sensitivität und Spezifität des Vorhersagemodells für das postoperative Trainingsset

Sensitivität	= (12/14)*100 = 85,71%
Spezifität	= (11/14)*100 = 78,57%

Des Weiteren wurde das anhand von postoperativen Urinen erstellte Vorhersagemodell mittels eines unabhängigen Testsets überprüft, mit folgenden Ergebnissen (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Unabhängiges neues Testset bestehend aus postoperativen Proben

mit Rejektion			ohne Rejektion		
Probe	vorhergesagter Rejektionszustand mit/ohne	Zuordnung mittels Software korrekt/falsch	Probe	vorhergesagter Rejektionszustand mit/ohne	Zuordnung mittels Software korrekt/falsch
1404	mit	korrekt	1403	mit	falsch
1535	mit	korrekt	1416	ohne	korrekt
1564	mit	korrekt	1435	ohne	korrekt
1638	mit	korrekt	1436	ohne	korrekt
1646	ohne	falsch	1441	ohne	korrekt
1913	ohne	falsch	1448	ohne	korrekt
1921	mit	korrekt	1455	ohne	korrekt
1949	mit	korrekt	1465	mit	falsch
2118	mit	korrekt	1472	ohne	korrekt
2128	ohne	falsch	1496	mit	falsch
2210	ohne	falsch	1510	ohne	korrekt
2255	mit	korrekt	1542	ohne	korrekt
2355	mit	korrekt	1547	ohne	korrekt

Die Sensitivität für dieses Testset betrug 76,92 % und die Spezifität 69,23%.

4.1.6 Ermittlung eines spezifischen Proteinmusters zur Unterscheidung der Rejektionsart

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob anhand eines Proteinmusters im Urin die Art der Rejektion unterschieden werden kann bzw. ob es ein spezifisches Proteinmuster für die vaskuläre bzw. für die interstitielle Rejektion gibt. In Tabelle 31 befinden sich Informationen zur Rejektionsart der verwendeten postoperativen Patientenproben.

Tabelle 31: Übersicht die verwendeten Patientenproben und deren Art der Rejektion

<u>vaskuläre Rejektion</u>	<u>interstitielle Rejektion</u>	<u>ohne Rejektion</u>
----------------------------	---------------------------------	-----------------------

564	243	426	1949	518	785	1184
586	252	433	2355	602	824	1257
1646	282	759		722	847	1261
2255	337	1015		762	947	
	389	1921		784	1004	

4.1.6.1 Unterscheidung von vaskulärer und interstitieller Rejektion

Hierzu wurden 12 postoperative Urinproben von Patienten mit bioptisch gesicherter interstitieller Rejektion mit vier Patientenproben mit vaskulärer Rejektion verglichen und mittels XL-Miner 3.5 ein Vorhersagemodell erstellt (siehe Tabelle 32). Das Signifikanzniveau betrug $\alpha = 0,6$.

Tabelle 32: Modell zur Vorhersage der Art der Rejektion anhand von postoperativen Urinen

Rule						Relevance Index
IF	175.986 Da LOW	AND	103.700 Da LOW	THEN	vaskuläre Rejektion	0,56354
	OR 7.772 Da HIGH		OR 92.340 Da LOW			
IF	7.686 Da LOW OR 63.448 Da HIGH	AND	6.654 Da LOW OR 7.772 Da LOW	THEN	interstitielle Rejektion	0,33165

Mit diesem Modell konnten zu 100% sowohl die vaskuläre als auch die interstielle Rejektion korrekt den Proben zugeordnet werden.

4.1.6.2 Unterscheidung von Patientenproben mit interstitieller Rejektion und ohne Rejektion

Auch hier wurden dieselben 12 Patientenproben mit interstieller Rejektion gegen 14 Proben von Patienten ohne Rejektion verglichen. Anhand dieses Trainingssets wurde ein spezielles Vorhersagemodell erstellt ($\alpha = 0,8$), welches in Tabelle 33 dargestellt ist.

Tabelle 33: Modell zur Vorhersage einer interstitiellen Rejektion mittels postoperativer Urine

Rule						Relevance Index
IF	76.517 Da LOW	AND	2.983 Da LOW	THEN	interstitielle Rejektion	0,17603
	OR 2.983 Da LOW		OR 75.136 Da LOW			
IF	76.517 Da LOW	AND	60.622 Da LOW	THEN	ohne Rejektion	0,17503
	OR 101.037 Da LOW		OR 101.037 Da LOW			

Mit Hilfe dieses am Trainingsset erstellten Modells konnten 10 der 12 Proben mit interstitieller Rejektion (außer Probe 252 und 337) und alle 14 Proben ohne Rejektion korrekt zugeordnet werden. Das Modell weist somit eine Sensitivität von 83,3 % und eine Spezifität von 100 % auf.

4.1.6.3 Unterscheidung von Patientenproben mit vaskulärer Rejektion und ohne Rejektion

Die Untersuchung der Patientenproben mit vaskulärer Rejektion im Vergleich zu der Gruppe an Proben ohne Rejektion erbrachte kein zuverlässiges Vorhersagemodell und sollte mit einer größeren Anzahl an Urinen von Patienten mit vaskulärer Rejektion gegebenenfalls noch einmal durchgeführt werden.

4.2 2D-PAGE

Als Vorversuch für die geplante Multiplex-2D-Gelelektrophorese wurde zunächst eine 2D-PAGE angefertigt (siehe Abschnitt 3.2.2). Hierzu wurde die Probe 759 eines Patienten mit Rejektion, entnommen am 9. postoperativen Tag, verwendet.

Zunächst wurde dazu die Probenkonzentration bestimmt. Die Ergebnisse der Mehrfachbestimmung und anschließenden Errechnung des Mittelwerts sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Tabelle 34: Ergebnisse der Bestimmung der Proteinkonzentration von Probe 759

	Messwert I	Messwert II	Messwert III	Mittelwert
Probe 759	0,78	1,26	0,64	0,89 mg/ml

Die Messungen ergaben eine Proteinkonzentration von 0,89 mg/ml. Da das Auftragen von 60 µg Protein vom Hersteller empfohlen wird, ergab sich das benötigte Probenvolumen von 67,4 µl für die Anfertigung des 2D-Gelbildes. In Abbildung 9 ist das entstandene, anschließend mit Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbte Gelbild zu sehen.

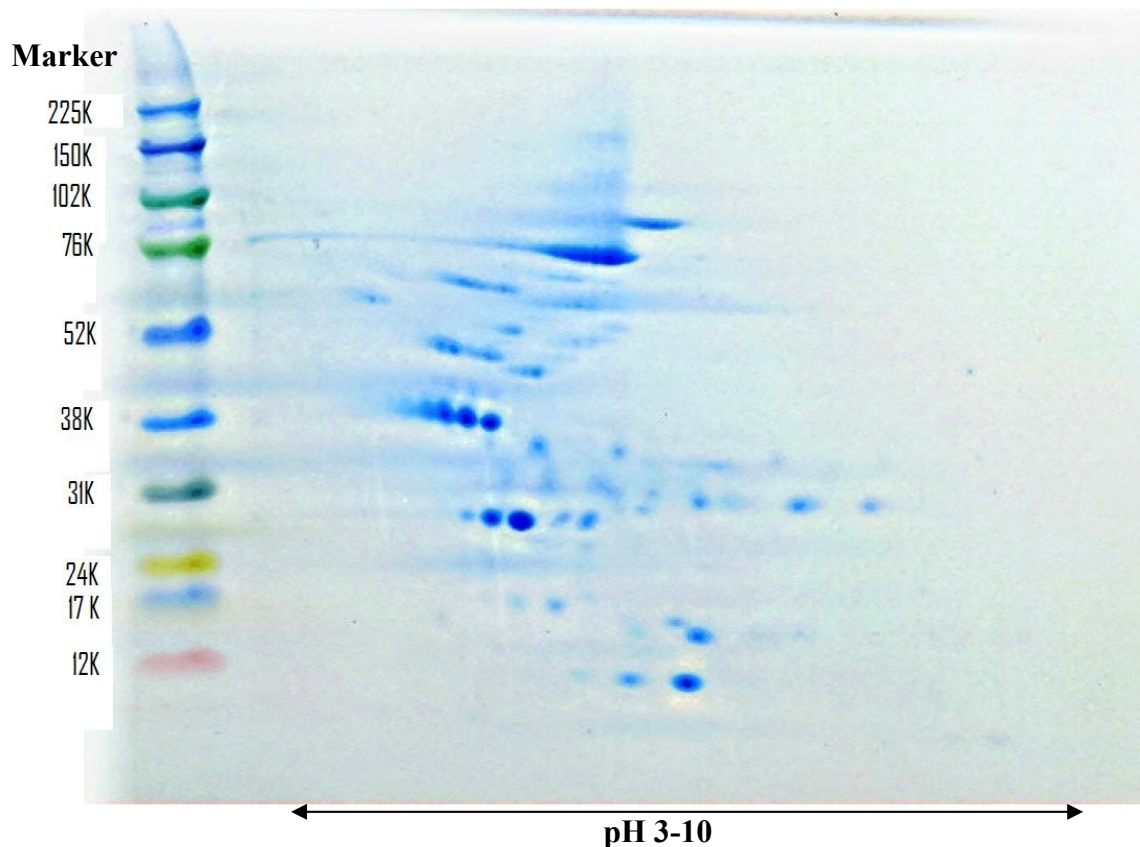


Abbildung 9: 2D-PAGE der Probe 759 (pH-Bereich 3-10, Rainbow™ Molecular Weight Marker von 12 – 225 kDa)

4.3 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Urin nach Bradford

Da für die geplante Multiplex-2D-Gelelektrophorese eine bestimmte Proteinmenge markiert und aufgetragen werden muss, wurde zunächst der Proteingehalt der Proben bestimmt.

Die Proteinkonzentrationen der Urine wurden mit Hilfe des Bradford-Tests ermittelt. Hierbei wurde für alle in der SELDI-TOF-MS benutzten postoperativen Urinproben der Proteingehalt bestimmt, da für die Untersuchung eine bestimmte Anzahl an Proben gepoolt auf die Gele gegeben wurden. Auch für die spätere Auswertung der ELISA-Untersuchung wurden die durchgeführten Bradford-Messungen noch einmal herangezogen.

In den Tabellen 35 und 36 wurde auf die Ergebnisse der Durchschnittskonzentrationen der einzelnen Verdünnungsschritte verzichtet und nur die Proteinkonzentrationen, welche nach der Doppelbestimmung und der Einberechnung des Verdünnungsfaktors bestimmt wurden, aufgelistet sowie die daraus bestimmte Gesamtproteinkonzentration in der letzten grau unterlegten Spalte dargestellt.

Tabelle 35: Proteinkonzentration der Patientenproben „ohne Rejektion“*Der Verdünnungsfaktor ist bereits in die angegebenen Teilergebnisse einberechnet.*

Probe	Entnahme- Tag (post- operativ)	Durchschnitts- konzentration [µg/ml] 1:5	Durchschnitts- konzentration [µg/ml] 1:10	Gesamtprotein- konzentration in [µg/ml]
518	5	467	561	514,0
602	9	161,5	236	198,75
722	9	447	636	541,5
784	5	181,5	148	164,75
824	9	670,5	878	774,25
947	9	91	59	75,0
1004	3	8.688,0	8040,0	8364,0
1184	3	645	848	746,5
1257	9	1.671,5	1.657	1.664,25
1261	9	76,5	86	81,25
1393	3	1.150,5	1.237	1.193,75
1403	9	254,5	403	328,75
1448	3	290,5	273	281,75
1455	3	1.869,5	2.253	2.061,25
1465	5	2.216,5	1.615	1.915,75
1496	3	810,5	1.166	988,25

Da die Gesamtproteinkonzentrationen bei den Urinproben mit Rejektion schwankten, waren zur Bestimmung mittels Bradford unterschiedliche Verdünnungsschritte nötig, damit die Konzentration der verdünnten Probe im Bereich der Eichkurve zu liegen.

Tabelle 36: Proteinkonzentration der Patientenproben „mit Rejektion“*Der Verdünnungsfaktor ist bereits in die angegebenen Teilergebnisse einberechnet.*

Probe	Entnahme- Tag (post- operativ)	pur	1:1	1:3	1:5	1:10	1:20	1:40	µg/ml
243	9	178,4	166		170,5				171,633
252	9			2022	2.228	2714			2.321,33
282	9						18.508	20.684	19.596,0
337	5	593,5	761,4	989,4	1.103,5	1.205,0			930,56
433	9	493,4	498	427,2	427,2				479,525
564	9	184,8	138,2	139,5	139,5				170,125
582	9						3.382	2.860	3121,0
1015	5						15.388	23.204	19.296,0
1535	9	491,9	438,2		496,5				475,533
1646	3						3.468,0	3.324,0	3.396,0
1683	3	936,3	1305,2	1.482,0	1.977,0	2.388,0			1.617,7
1913	3						10.984	11.312	11.148,0
1921	3						5.676,0	4.996,0	5.336,0
1949	3	885,4	1.248,8	1.432,	1.759,0	2082,0			1.481,6

				8					
2118	3	747,1	972,4	1.189,8	1.150,0	1.461,5			1.104,16
2128	9						3.988	3.988	3.964,0

4.4 Proteinidentifizierung mit Hilfe der Multiplex-2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS

Der Probenpool 1 „ohne Rejektion“ und der Probenpool 2 „mit Rejektion“ wurden gemeinsam mittels Multiplex-2D-Gelelektrophorese auf einem Gel aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.2.4). In der Abbildung 10 befindet sich eine kombinierte Ansicht der gescannten Gele nach Übereinanderlagerung der Bilder der einzelnen Farbkanäle.

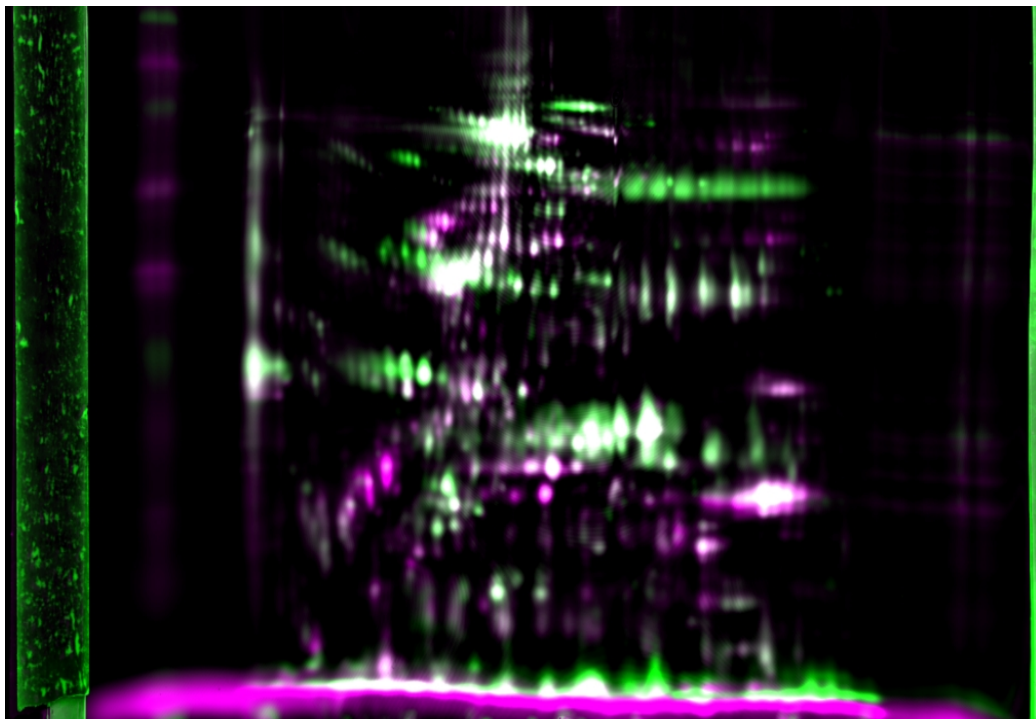


Abbildung 10: Abbildung aus dem Scanvorgang der Fluoreszenzgele – overlay view :

lila = Pool 1 (ohne Rejektion) ; grün = Pool 2 (mit Rejektion)

4.4.1 Auswertung mit Delta2D 4.2

Anschließend erfolgte eine Auswertung mit der Software Delta2D 4.2 . Hier wurden die Intensitäten der einzelnen Proteinspots ermittelt und zwischen den Gruppen „mit Rejektion“ und „ohne Rejektion“ durch den Abgleich des mitgeführten internen Standards verglichen. Insgesamt wurden 1020 Proteinspots detektiert. Die quantitative Analyse lieferte 401 unterschiedlich exprimierte Spots zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Es wurde

anschließend ein Filter angewendet, so dass nur Proteinspots betrachtet wurden, die mindestens eine 0,5- bzw. 2-fache Expression gegenüber der Vergleichsgruppe zeigten. Dabei konnten 149 Spots detektiert werden (siehe Abbildung 11).

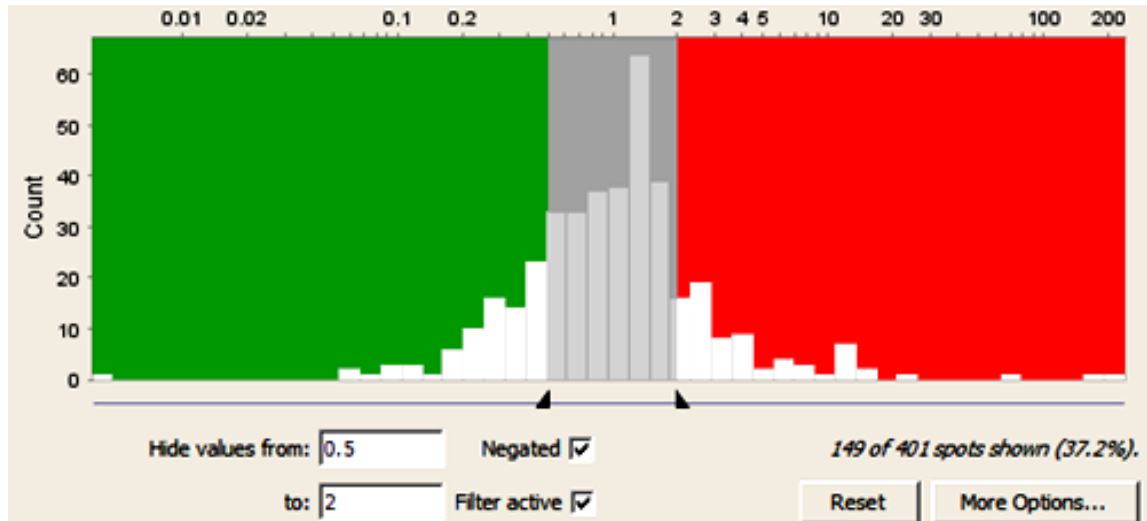


Abbildung 11: Histogramm der Kandidatenproteine mit mindestens 0,5- bzw. 2-fach unterschiedlicher Expression zwischen den untersuchten Gruppen
insg. 401 Spots; 149 entsprechend des Filters relevant; 252 Spots außerhalb der gesetzten Filtergrenzen= grau; grün = herunterreguliert; rot = hochreguliert

Die Durchführung eines T-Tests mit diesen 149 Proteinspots ergab in 117 Fällen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Gruppen „mit Rejektion“ und „ohne Rejektion“.

Diese wurden in einer Heatmap (s. Abb. 12) und in der Abbildung 13, welche auch die im Anschluss daran gepickten und verdaute Spots dick umrandet zeigt, noch einmal dargestellt.

-1,5 0,51 1,09

ohne Rejektion mit Rejektion

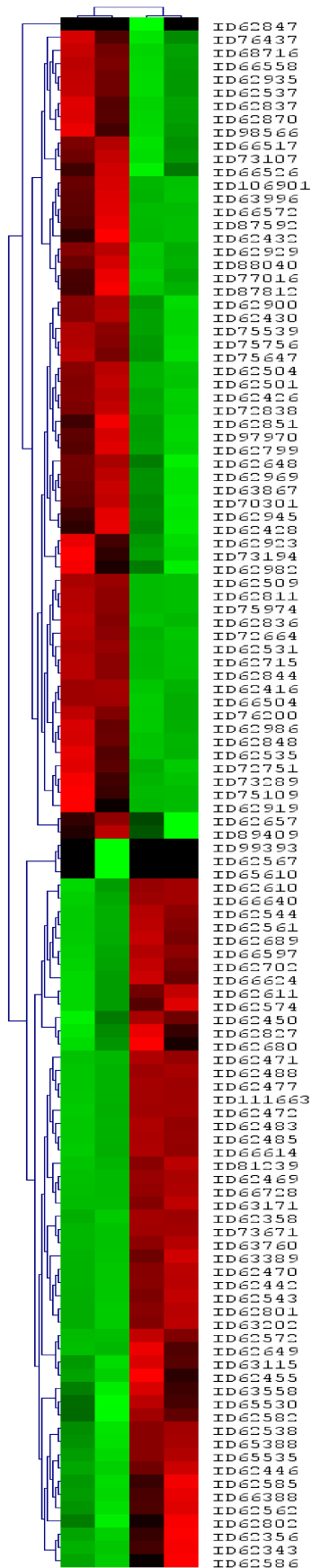
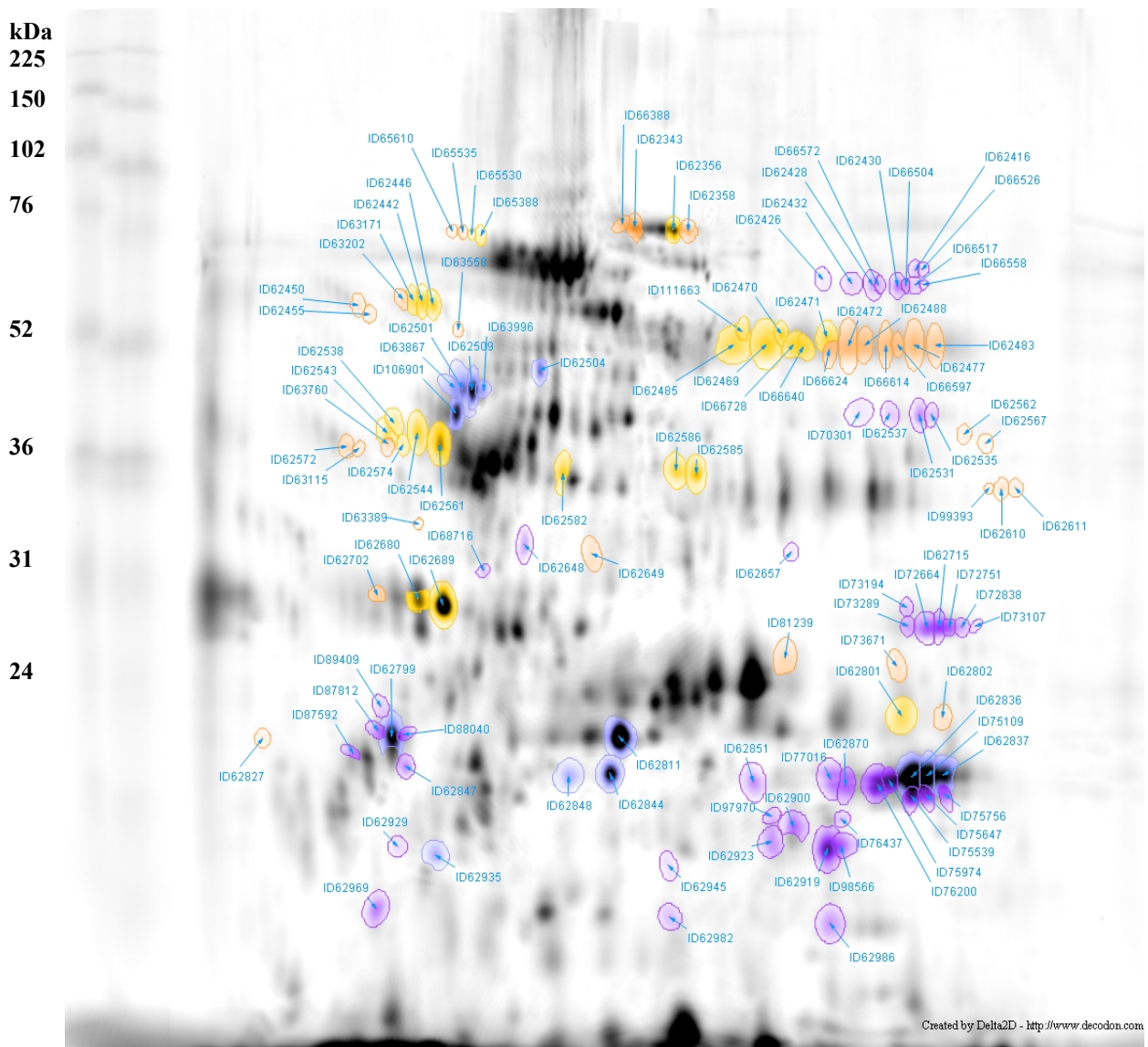


Abbildung 12: Heatmap signifikant unterschiedlicher Proteine (mind. 0,5- bzw. 2-facher Regulation)



- Keine Rejektion hochreguliert
- Keine Rejektion hochreguliert, gepickt
- mit Rejektion hochreguliert
- Mit Rejektion hochreguliert, gepickt

Abbildung 13: Übersicht über die Lage der 117 signifikant unterschiedlich exprimierten Spots mit gruppenspezifischer Umrandung im Gel (*Gruppe ohne Rejektion (Pool 1) stärker exprimiert sind (lila) bzw. in der Gruppe mit Rejektion (Pool 2) (orange)*) sowie Markierung der gepickten Spot (*ohne Rejektion = blau; mit Rejektion =gelb*)

Es konnten 28 dieser relevanten Spots nach einer Coomassie Brilliant Blue G-250-Färbung aus dem Gel gepickt und für den anschließenden tryptischen Verdau vorbereitet werden. In der nachfolgenden Tabelle 37 wurden diese Proteinen der p-Wert zugeordnet.

Tabelle 37: Auswertung der Software Delta2D 4.2

Ratio (mit Rejektion/ohne Rejektion) gibt die unterschiedliche Expression der Proteine zwischen den Gruppen an.

ohne Rejektion	mit Rejektion	mit Rejektion / ohne Rejektion (ratio 0,5-2)	p-Wert ($\alpha=0,05$)	Label-Nummer
52,17805	223,0954	4,27566	0,03497	ID 62356
15,07542	169,784	11,26231	0,00426	ID 62442
15,16493	183,7104	12,11416	0,01542	ID 62446
37,57282	136,1724	3,62423	0,00055	ID 62471
110,66214	32,409	0,29286	0,00351	ID 62501
114,05296	49,7502	0,4362	0,00184	ID 62504
24,92415	156,1665	6,26567	0,00233	ID 62544
24,11775	297,8813	12,35112	0,04076	ID 62561
60,23798	140,6569	2,33502	0,0318	ID 62582
76,63293	177,4821	2,316	0,02515	ID 62585
71,7311	203,4722	2,8366	0,04981	ID 62586
46,75109	123,3859	2,63921	0,04228	ID 62680
48,84139	124,1318	2,54153	0,0047	ID 62689
175,07645	20,06839	0,11463	0,02862	ID 62799
54,57615	114,9302	2,10587	0,00238	ID 62801
122,884	47,87879	0,38963	0,00082	ID 62811
203,49683	83,04594	0,40809	0,00217	ID 62836
154,35345	25,93649	0,16803	0,00243	ID 62844
174,42835	20,00505	0,11469	0,01717	ID 62848
151,79736	54,59827	0,35968	0,00883	ID 62935
110,2742	32,63414	0,29594	0,01282	ID 63867
132,5975	32,12027	0,24224	0,01364	ID 63996
37,87387	165,4284	4,36788	0,02778	ID 65530
74,14904	171,68082	2,31535	0,00856	ID65388
40,70955	132,2658	3,24901	0,0012	ID 66640
221,99229	88,26807	0,39762	0,02266	ID 75109
121,08794	55,44067	0,45785	0,0064	ID 106901

4.4.2 In-Gel-Verdau mit Trypsin und anschließende MALDI-TOF-MS

Anschließend erfolgte ein In-Gel-Verdau der ausgestochenen Gelstücke. Dazu wurden die Proteine mit der Protease Trypsin in Peptidfragmente spezifischer Länge geschnitten. Mithilfe der MALDI-TOF-MS und einer anschließenden Datenbankanalyse konnten einige der Proteinspots identifiziert werden. In der Tabelle 38 befinden sich die Ergebnisse aus der MASCOT-Datenbank-Auswertung.

Tabelle 38: Ergebnis der Proteinidentifizierung mit Hilfe der MASCOT-Datenbank

Spot-ID	Name	MW [kDa]	Mascot Score	Peptide
ID 62442	unnamed protein product	35,09	118	10
ID 62442	Chain A, Alpha-1-Antitrypsin	44,22	108	11
ID 62446	Chain A, Alpha-1-Antitrypsin	44,22	132	14
ID62501	Albumin, Isoform CRA h	68,57	180	22
ID62504	unnamed protein product	69,25	196	21
ID62504	Chain A, Structure of Human Serum Albumin With S-Naproxen And The Ga Module	65,78	210	21
ID62561	Chain A, Human Serum Albumin in a Complex with Myristic Acid and Tri-Iodobenzoic Acid	65,99	77,4	14
ID62561	HP protein / Haptoglobin	38,36	106	15
ID 62582	Chain B, Crystal Structure of Fibrinogen Fragment D	37,62	216	26
ID 62586	Chain A, Apo-Human Serum Transferrin (glycosylated)	74,82	147	18
ID 62586	Chain A, Human Serum Transferrin (Transferrin- like 1 oder 2 Domäne im 74 kDa-Molekül)	36,33	152	16
ID 62586	Chain A, Human Serum Transferrin, N-Lobe Bound with Oxalate (Transferrin-like 1 oder 2 Domäne im 74 kDa-Molekül)	36,14	168	17
ID62689	Protein AMBP Präproprotein	38,97	91,1	8
ID62689	Protein AMBP Präproprotein	38,97	69,16	4
ID62680	Complex-forming Glycoprotein HC	20,42	78,9	7
ID62680	Protein AMBP Präproprotein	38,97	78	8
ID62799	ALB Protein	47,33	95,4	10
ID62799	Syndecan Binding Protein, Isoform CRA b	22,40	28,7	4
ID62799	2-Aminoethanethiol Dioxygenase	29,73	29,2	3
ID62799	Serine/Threonine-Protein Phosphatase PP1-Alpha Catalytic Subunit Isoform 2	32,57	24,4	4
ID62801	Immunoglobulin Heavy Chain variable region	9,37	32	2
ID62801	Immunoglobulin Heavy Chain variable region	16,50	27,3	2
ID62811	unnamed protein product	23,11	25,7	4
ID62811	IMPACT Protein (Isoform 2)	22,97	26	5
ID62811	Albumin, Isoform CRA a	25,28	49,5	7
ID62837	Immunoglobulin Heavy Chain variable region	9,04	21,7	2
ID62848	Procollagen-Proline, 2-Oxoglutarate 4- Dioxygenase (Proline 4-Hydroxylase), Alpha Polypeptide III, Isoform CRA c	29,64	21,6	3
ID62848	MHC-Klasse-I-Antigen	31,37	22,3	2
ID62935	unnamed protein product	31,62	18,9	3
ID62935	Truncated Zinc Finger Protein Isoform	24,36	21,1	2
ID63867	Albumin-like Protein	52,05	130	12
ID63867	unnamed protein product	70,32	116	13
ID63867	unnamed protein product	69,25	250,92	8
ID75109	Immunoglobulin Heavy Chain variable region	10,34	25,6	2
ID75109	MHC-Klasse-I-Antigen	21,31	19,5	2

ID75109	Immunoglobulin Heavy Chain variable region (Fragment)	13,11	6,59	1
ID75109	Immunoglobulin Heavy Chain variable region	13,55	6,59	1
ID75109	2-19 Protein	25,05	9,41	1
ID106901	PRO2619	56,75	93,4	11
ID106901	Serum Albumin	69,32	101,60	6

Hierbei wurden drei Proteine besonders hervorgehoben, da sie signifikant und deutlich erhöht in den Urinproben der Patienten mit Rejektion im Vergleich zu den Proben der Patienten ohne Rejektion vorkamen.

Dabei handelte es sich um Alpha-1-Antitrypsin (ID62442), welches 11- bis 12-fach erhöht bei den Patienten mit Rejektion vorlag, um das bei Rejektion 2,8-fach erhöht vorkommende Transferrin (ID62586) und zum anderen um das Protein Haptoglobin (ID62561), welches 2,2-fach erhöht bei Patienten mit Rejektion vorlag.

In Tabelle 39 und Abbildung 14 sind diese Kandidatenproteine zusammenfassend mit Informationen und Lage im Gel zusammengestellt.

Tabelle 39: Übersicht über die drei Kandidaten

Label	Proteinname	ohne Rejektion	mit Rejektion	mit Rejektion / ohne Rejektion (ratio < 0,5 und > 2)	p-Wert ($\alpha=0,05$)
ID62561	Haptoglobin	49,00533	109,66773	2,23787	0,04076
ID62586	Transferrin	71,7311	203,47222	2,8366	0,04981
ID62442	Alpha-1-Antitrypsin	15,07542	169,78404	11,26231	0,00426
ID62446	Alpha-1-Antitrypsin	15,16493	183,7104	12,11416	0,01542

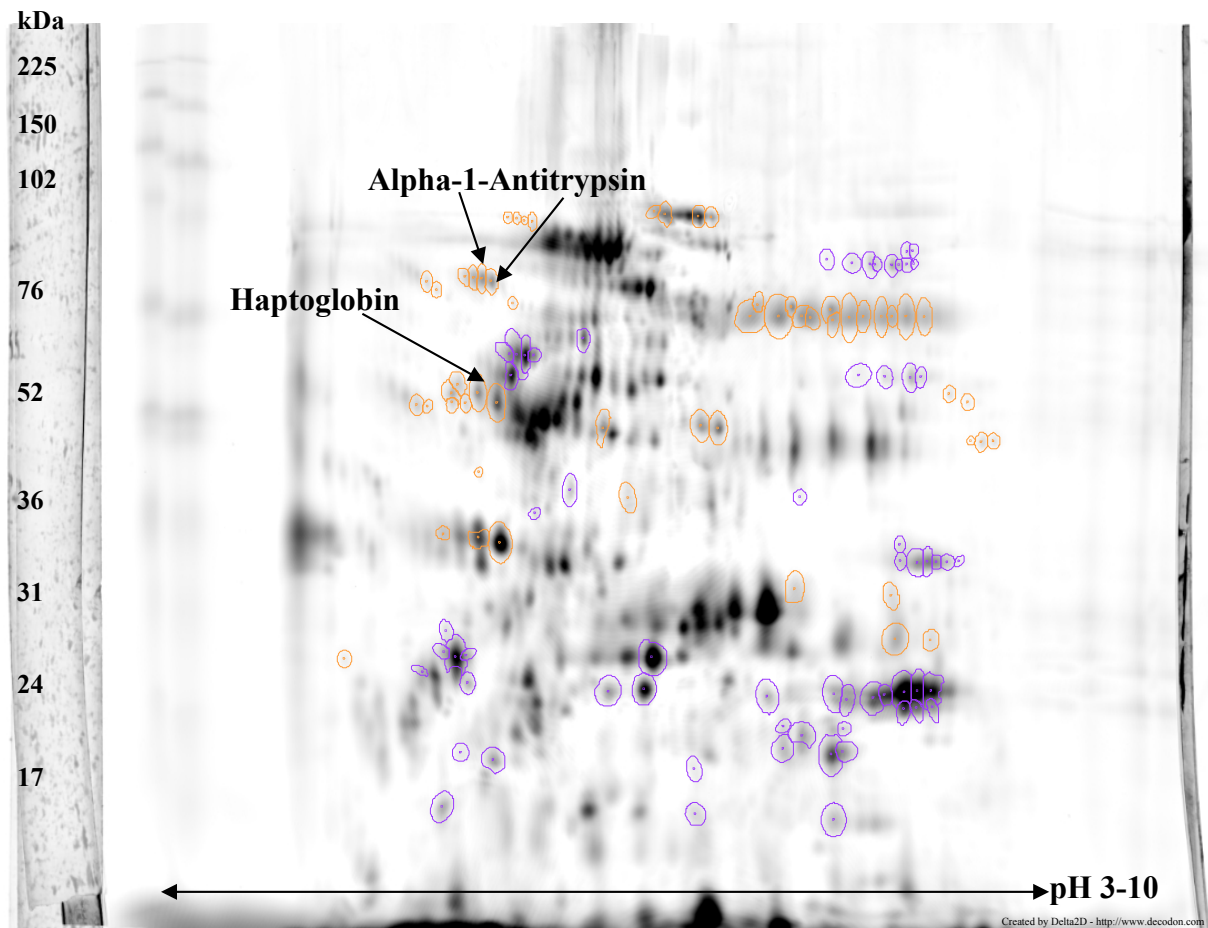


Abbildung 14: Die drei signifikant unterschiedlich exprimierten (dick markierte) im Überblick
orange = stärker exprimiert bei mit Rejektion, lila = hochreguliert bei ohne Rejektion

Die Abbildung 15 zeigt die einzelnen Spots der 3 Kandidaten in der Multiplex-2D-Gelelektrophorese nochmals in einem direkten Vergleich nebeneinander.

ohne Rejektion		mit Rejektion		interner Standard	
Gel 2	Gel 1	Gel 2	Gel 1	Gel 2	Gel 1
Pool 2	Pool 2	Pool 4	Pool 4	Standard	Standard
Alpha-1-Antitrypsin (ID 62442)					
Alpha-1 Antitrypsin (ID 62446)					
Haptoglobin (ID 62561)					
Transferrin (ID 62586)					

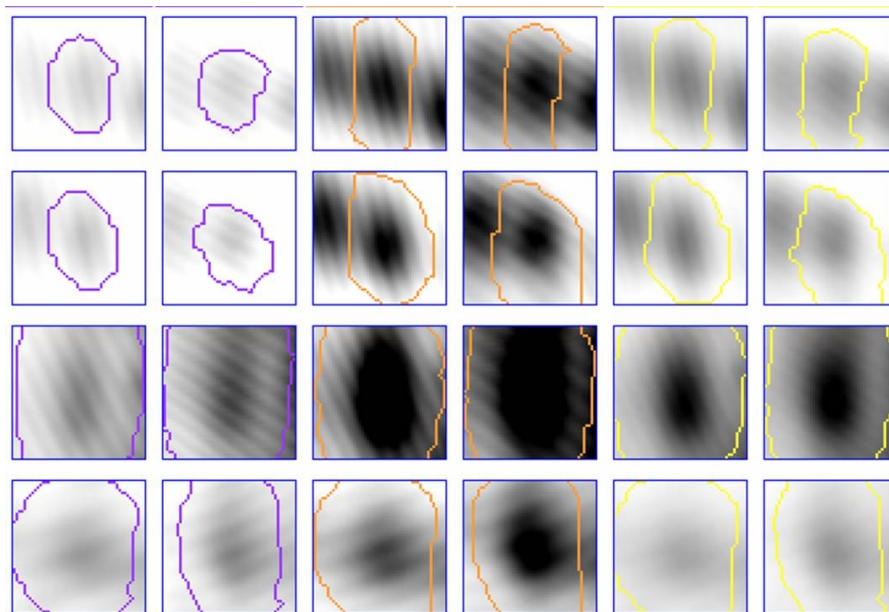
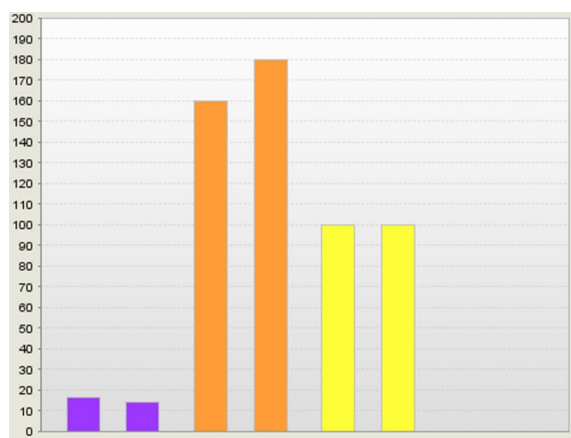
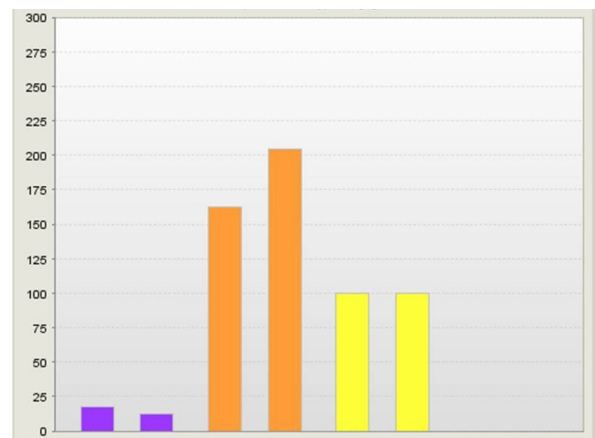


Abbildung 15: Vergleichende Übersicht (Spotalbum) über die Spots der Kandidatenproteine in der Multiplex-2D-Gelelektrophorese

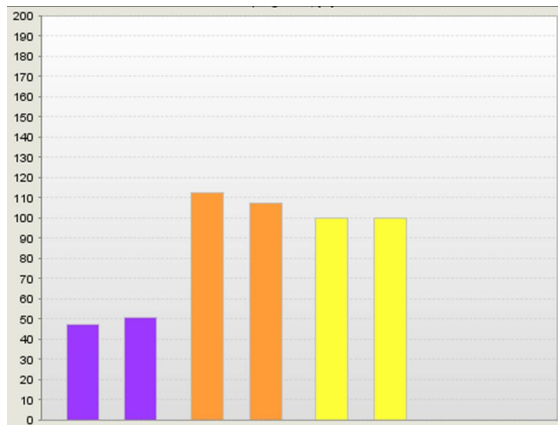
Mit Hilfe der Software konnte ebenfalls eine Gegenüberstellung der unterschiedlichen Expression dieser drei Proteinspots dargestellt werden (siehe Abbildung 16 a bis d).



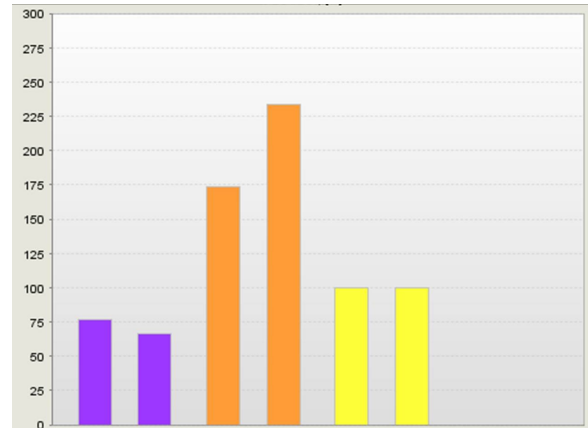
a): Profil von ID 62442 (Alpha-1-Antitrypsin)



b): Profil von ID 62446 (Alpha-1-Antitrypsin)



c): Profil von ID 62561 (Haptoglobin)



d): Profil von ID 62586 (Transferrin)

Abbildung 16: Expressionsprofile der Kandidatenproteine

lila Balken: ohne Rejektion, oranger Balken: mit Rejektion, gelber Balken: Standard; je zwei Balken für die Doppelbestimmung auf den zwei Gelen

4.5 Western Blot

Zum immunologischen Nachweis und zur Lokalisation der Kandidatenproteine Alpha-1-Antitrypsin und Haptoglobin wurden Western Blots durchgeführt. In den folgenden Abbildungen 17 und 18 sind die gescannten 2D-Gele und die davon angefertigten Blots dargestellt. Für das Protein Alpha-1-Antitrypsin sind in der Datenbank UniProtKB/Swiss-Prot verschiedene Isoformen gelistet, welche mit Hilfe eines solchen Western Blots dargestellt werden können (Isoform 1 (46,737 kDa), Isoform 2 (40,263 kDa), Isoform 3 (34,755 kDa)). Des Weiteren können sowohl posttranslationale Modifikationen (PTM) als auch natürliche Varianten des Proteins in dem betrachteten pI-Bereich von 3 bis 10 detektiert werden.

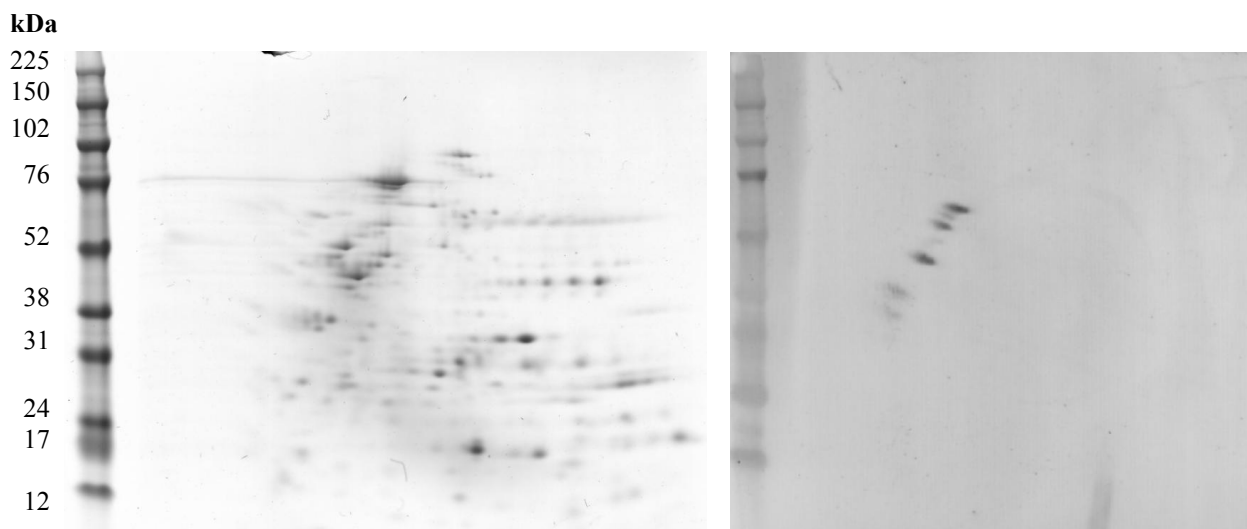


Abbildung 17: Alpha-1-Antitrypsin: Multiplex-2D-Gelelektrophorese (li) und Western Blot (re)

Bei dem Kandidatenprotein Haptoglobin handelt es sich um ein Tetramer, welcher aus jeweils zwei Alpha- und Beta-Ketten besteht. In dem Blotbild ist sowohl ein Konglomerat aus α - und β -Kette bei 45 kDa zu finden, als auch einzelne β -Kette (27 kDa) und α -Kette (15,6 kDa). Auch dieses Protein besitzt natürliche Varianten, bei denen einzelne Aminosäuren ausgetauscht sind und das wiederum die Ladung und die Konfiguration nach außen verändert. (Datenbank UniProtKB/Swiss-Prot) Daher sind ebenfalls mehrere Spots mit verschiedener Ladung in dem Blotbild zu finden.

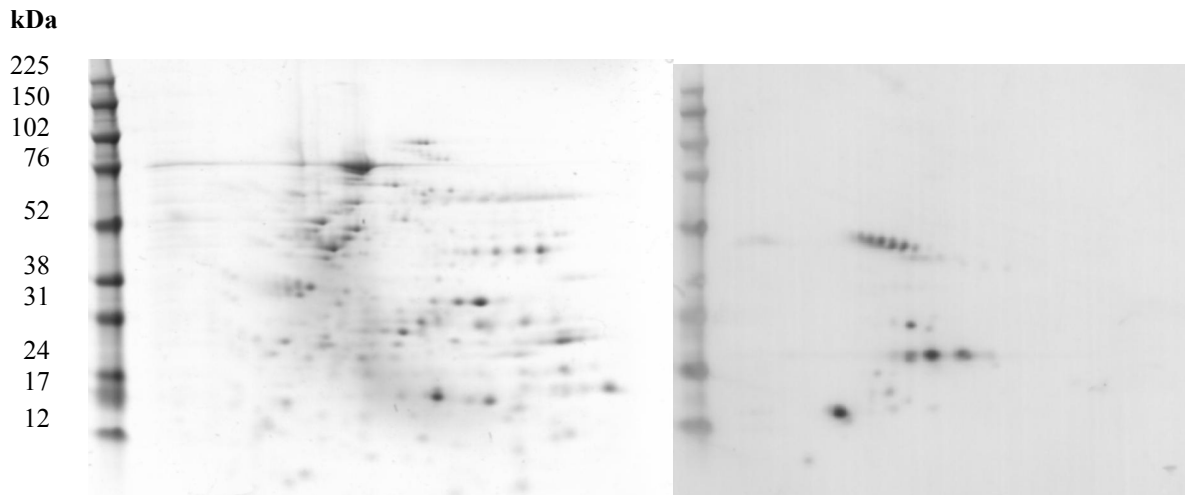


Abbildung 18: Haptoglobin: *Multiplex-2D-Gelelektrophorese (li) und Western Blot (re)*

4.6 Quantifizierung des Kandidatenproteins Alpha-1-Antitrypsin mittels ELISA

Die quantitative Ermittlung der Konzentrationen im Urin erfolgte unter Verwendung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) anhand von 32 Proben, von denen 16 Proben von Patienten mit Rejektion und 16 Proben von Patienten ohne Rejektion stammten. Des Weiteren wurde die Gesamtproteinkonzentration der Urinproben mittels Bradford-Assay bestimmt. Tabelle 40 zeigt die Konzentrationen von Alpha-1-Antitrypsin sowie die Gesamtproteinkonzentrationen in den Proben. Außerdem wurde das Verhältnis aus Alpha-1-Antitrypsin und Gesamtkonzentration für jeden Patienten errechnet.

Tabelle 40: Übersicht über die berechneten Alpha-1-Antitrypsin-Konzentrationen

mit Rejektion			
Probe	(Absolut-) Konzentration AAT [$\mu\text{g/ml}$]	Gesamtprotein- konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Verhältnis [AAT]: [Gesamtprotein]
243	0,45589	171,63	0,2656
252	1,33376	2.321,33	0,05746

282	7,3833	19.596	0,03768
337	1,86452	930,56	0,20037
433	0,90256	479,525	0,1882
564	0,63641	170,125	0,37408
582	1,69024	3.121,0	0,05416
1015	2,4375	19.296,0	0,01263
1535	0,49275	475,53	0,10362
1646	11,4736	3.396,0	0,33786
1683	0,90082	1.617,7	0,05569
1913	2,7118	11.148,0	0,02433
1921	2,226	5.336,0	0,04172
1949	1,96941	1.481,6	0,13292
2118	1,14109	1.104,16	0,10334
2128	1,97784	3.964,0	0,04990
ohne Rejektion			
518	0,77385	514,0	0,150554475
602	0,042336	198,75	0,021301132
722	4,6491	541,5	0,858559557
784	2,6769	164,75	1,624825493
824	1,1117	774,25	0,143584114
947	0,37545	75,0	0,5006
1004	2,069	8.364,0	0,024736968
1184	4,9228	746,5	0,65945077
1257	1,77282	1.664,25	0,106523659
1261	0,84449	81,25	1,039372308
1393	1,09309	1.193,75	0,091567749
1403	1,81633	328,75	0,552495817
1465	4,0606	1.915,75	0,211958763
1448	4,5219	281,75	1,604933452
1496	2,1504	2.061,25	0,104325045

4.7 Statistische Datenauswertung

4.7.1 Auswertung der Konzentrationsbestimmung aus ELISA und Bradford

In der Software SPSS 19.0 wurde eine statistische Auswertung der Ergebnisse vorgenommen.

Die durchschnittliche Konzentration des Proteins Alpha-1-Antitrypsin (AAT) im Urin der Patienten mit Rejektion betrug 2,48655 µg/ml. Bei den gemessenen Urinproben der Patienten ohne Rejektion lag die durchschnittliche AAT-Konzentration bei 2,03080 µg/ml.

In der Tabelle 41 befindet sich eine Übersicht über die mittleren Konzentrationen und die Standardabweichung der Mittelwerte der drei betrachteten Parameter in den beiden Gruppen.

Tabelle 41: Zusammenfassung aus der SPSS-Software

	„mit Rejektion“		„ohne Rejektion“	
	Mittelwert der Konzentrationen	Standard-abweichung	Mittelwert der Konzentrationen	Standard-abweichung
AAT-Konz. [µg/ml]	2,48655	0,61105	2,03080	0,32512
Gesamtkonz.[µg/ml]	4663,07	1595,53	1307,47	531,42
Verhältnis [AAT]:[Gesamt]	0,1266	0,02829	0,5120	0,14119

Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests, einem parameterfreien statistischen Test, bei dem keine Normalverteilung der Proben vorausgesetzt wird, wurde auf Homogenität überprüft. Dabei wird in der Nullhypothese von der Homogenität der Stichproben ausgegangen, d.h. das beide zu überprüfenden Gruppen einer Grundgesamtheit angehören. Wird diese zum angegebenen Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ abgelehnt, ist nachgewiesen, dass die Gruppen sich bezüglich der getesteten Variablen tatsächlich unterscheiden.

Hierbei ergab der Hypothesentest keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit Rejektion und ohne Rejektion für die Absolutkonzentration des Proteins AAT ($\alpha = 0,953$). Jedoch sind sowohl die Verteilung der Gesamtproteinkonzentration ($\alpha = 0,04$) als auch das Verhältnis aus der Absolutkonzentration von AAT im Urin zur Gesamtproteinkonzentration in der Probe ($\alpha = 0,023$) zwischen den Patientenproben mit und ohne Abstoßung signifikant unterschiedlich.

Auch in der Boxplot-Darstellung in Abbildung 19 kann der signifikante Zusammenhang noch einmal grafisch präsentiert werden.

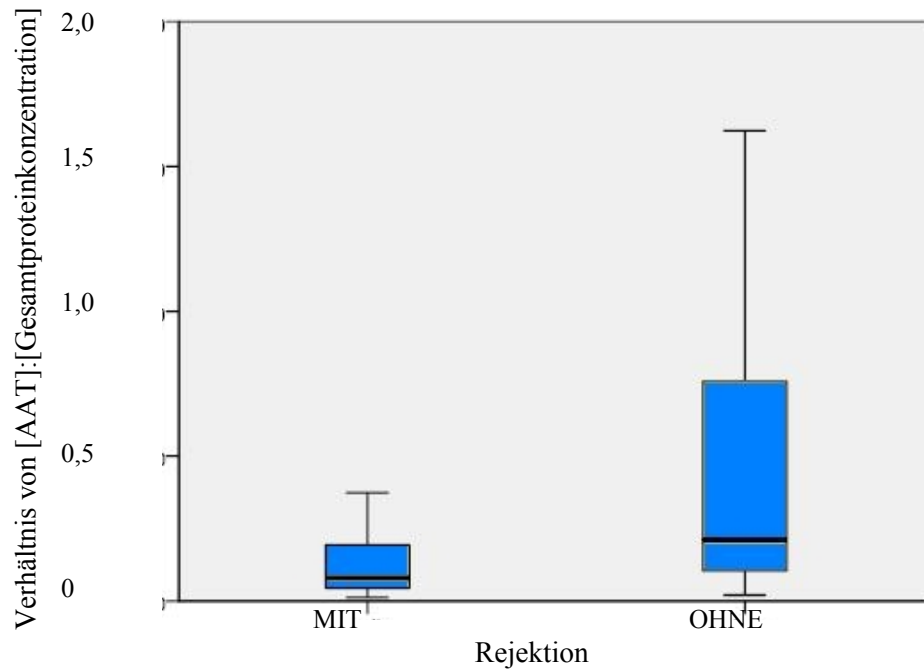


Abbildung 19: Box-Whisker-Plot des Verhältnisses der Alpha-1-Antitrypsin-Konzentration zur Gesamtproteinkonzentration

4.7.2 Ermittlung eines Cut-Off-Wertes für das Verhältnis von [AAT]:[Gesamtprotein]

Zur Festlegung eines Cut-Off-Wertes für das Verhältnis von AAT-Konzentration und Gesamtproteinkonzentration, anhand dessen man dann die Patienten als „mit“ oder „ohne Rejektion“ einteilen kann, wurde der Youden-Index benutzt. In der folgenden Abbildung 20 befindet sich die ermittelte ROC-Kurve sowie der Wert der AUC (Area under the curve).

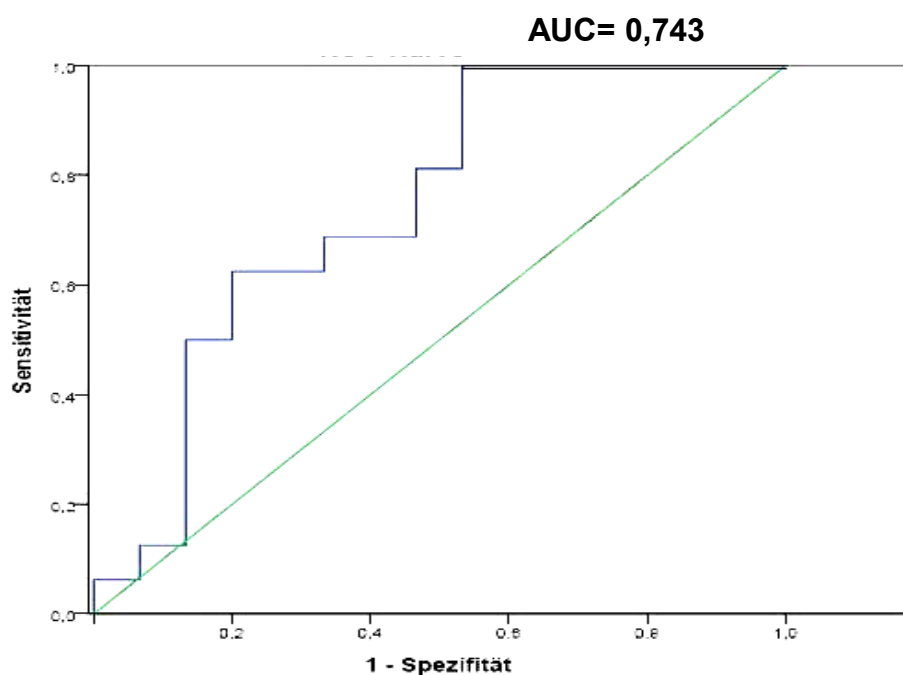


Abbildung 20: ROC-Kurve für das Verhältnis [AAT]:[Gesamtprotein]

Mit Hilfe dieser Kurve wurden für alle Verhältnisse die jeweilige Sensitivität und Spezifität errechnet. Das Verhältnis mit der maximalen Summe aus Sensitivität und Spezifität (Youden-Index) wurde als Cut-Off-Wert festgelegt. Es wurde das Verhältnis von 0,4373 ausgewählt.

Tabelle 42: Übersicht über Koordinaten der ROC-Kurve mit der jeweiligen Sensitivität und 1- Spezifität

grau unterlegt = ausgewähltes Verhältnis mit größter Summe aus den beiden Werten

positiv, wenn \geq	Sensitivität	1-Spezifität
1,6149	1,000	0,933
1,3222	1,000	0,867
0,9490	1,000	0,800
0,7590	1,000	0,733
0,6060	1,000	0,667
0,5265	1,000	0,600
0,4373	1,000	0,533
0,3560	0,938	0,533
0,3017	0,875	0,533
0,2388	0,813	0,533
0,2062	0,813	0,467
0,1943	0,750	0,467
0,1694	0,688	0,467
0,1471	0,688	0,400
0,1383	0,688	0,333
0,1197	0,625	0,333
0,1054	0,625	0,267
0,1040	0,625	0,200
0,1035	0,563	0,200
0,0975	0,500	0,200
0,0745	0,500	0,133
0,0566	0,438	0,133
0,0549	0,375	0,133
0,0520	0,313	0,133
0,0458	0,250	0,133
0,0397	0,188	0,133
0,0312	0,125	0,133
0,0245	0,125	0,067
0,0228	0,063	0,067
0,0170	0,063	0,000
-0,9874	0,000	0,000

Anhand dieses festgelegten Cut-off-Wertes von 0,4373 wurde eine Vierfeldertafel erstellt (siehe Tabelle 43). Durch dieses Verhältnis aus den Konzentration von Alpha-1-Antitrypsin zur Gesamtproteinkonzentration konnten bei 66 % der Patienten mit Abstoßung die Rejektion korrekt zugeordnet werden kann. Die Patienten ohne Rejektion wurden zu 100 % korrekt zugeordnet.

Tabelle 43: Sensitivität und Spezifität des AAT-Markers sowie positiv und negativ prädiktiver Wert dieses potentiellen Biomarker-Tests

	mit Rejektion	ohne Rejektion	
[AAT]:[Gesamtprotein] < 0,4373	16	8	PPW: 66%
[AAT]:[Gesamtprotein] ≥ 0,4373	0	7	NPW: 100%
	Sensitivität: 100%	Spezifität: 47%	<i>n</i> = 31

4.7.3 Überprüfung einer möglichen Einflussnahme von anderen klinischen Faktoren

Für die Untersuchung von Confoundern wurden Informationen bezüglich aufgetretener Harnwegsinfekte, Wundheilungsstörungen und Harntransportstörungen in den Tagen nach der OP recherchiert. Außerdem wurde der Einfluss des Alters und des Geschlechtes der Patienten untersucht (s. Tab. 44).

Tabelle 44: Informationen zu den Patientenproben

0 = kein Ereignis; 1 = Ereignis ist eingetreten (grau unterlegt)

statistische Auswertung											
mit Rejektion						ohne Rejektion					
Probe	HWI	HTS	WHS	Alter	Ge- schlecht	Probe	HWI	HTS	WHS	Alter	Ge- schlecht
243	0	0	0	65	m	518	0	0	0	60	m
252	0	0	0	57	w	602	0	0	0	41	w
282	0	0	0	47	m	722	0	0	0	65	m
337	1	0	0	65	w	784	0	0	0	32	m
433	0	0	0	65	m	824	0	0	0	46	w
564	1	0	0	51	m	947	0	0	0	35	w
582	0	0	0	40	w	1004	0	0	0	60	m
1015	0	0	0	65	w	1184	0	0	0	50	m
1535	0	0	1	65	w	1257	0	0	0	65	m
1646	0	0	0	38	w	1261	0	0	0	58	m
1913	0	0	0	42	m	1393	1	0	0	42	m
1921	0	0	0	21	m	1403	0	0	0	65	w
1949	0	0	0	28	m	1465	0	0	0	65	m
2118	0	0	0	42	w	1448	0	0	0	41	w
2128	0	1	0	37	w	1496	0	0	0	51	w

Die Faktoren sind mittels einer linearen Regression im SPSS 19.0 statistisch analysiert worden. In die Analyse wurden 30 Fälle einbezogen (je 15; 0 = ohne Rejektion und 1 = mit

Rejektion). Als abhängige Variable wurde das Verhältnis [AAT]:[Gesamtprotein] eingesetzt, als unabhängigen Variablen wurden die vermuteten Einflussfaktoren genutzt. Die Auswertung in der folgenden Tabellen 45 a bis f zeigt neben der Signifikanz des Einflusses der unabhängigen Variable auf die abhängige Variable außerdem noch den nicht-standartisierten Regressionskoeffizienten B, mit dem der jeweilige Einfluss auf die abhängige Variable noch näher quantifiziert werden kann.

Tabelle 45: Ergebnisse der binären logistischen Regression (a-f)

a) Überprüfung des Einflusses des AAT-Verhältnis auf die Rejektion

Modell	Nicht-standartisierter Koeffizient		Standardisierter Koeffizient		
	Regression-koeffizient B	Standard-fehler	Beta	T	Signifikanz
Rejektion	-0,381	0,145	-0,0446	-2,634	0,014
Konstante	0,513	0,102		5,020	0,000

b) Überprüfung des Einflusses des Auftretens eines Harnwegsinfektes (HWI)

Modell	Nicht-standartisierter Koeffizient		Standardisierter Koeffizient		
	Regression-koeffizient B	Standard-fehler	Beta	T	Signifikanz
Harnwegs-infekt	-0,112	0,258	-0,079	-0,417	0,680
Konstante	0,334	0,085		3,935	0,000

c) Überprüfung des Einflusses des Auftretens einer Harntransportstörungen (HTS)

Modell	Nicht-standartisierter Koeffizient		Standardisierter Koeffizient		
	Regression-koeffizient B	Standard-fehler	Beta	T	Signifikanz
Harntransport-störung	-0,282	0,082	-0,119	-0,632	0,533
Konstante	0,332	0,082		4,073	0,000

d) Überprüfung des Einflusses einer Wundheilungsstörung

Modell	Nicht-standartisierter	Standardisierter	
---------------	------------------------	------------------	--

	Koeffizient		Koeffizient		
	Regression- koeffizient B	Standard- fehler	Beta	T	Signifikanz
Wundheilungs- störung	-0,227	0,448	-0,095	-0,506	0,617
Konstante	0,330	0,082		4,040	0,000

e) Überprüfung des Einflusses des Geschlecht

Modell	Nicht-standartisierte Koeffizient		Standardisierter Koeffizient		
	Regression- koeffizient B	Standard- fehler	Beta	T	Signifikanz
Geschlecht	0,090	0,161	0,105	0,0558	0,581
Konstante	0,275	0,118		2,338	0,027

f) Überprüfung des Einflusses des Patientenalters

Modell	Nicht-standartisierte Koeffizient		Standardisierter Koeffizient		
	Regression- koeffizient B	Standard- fehler	Beta	T	Signifikanz
Alter	-0,003	0,006	-0,097	-0,516	0,610
Konstante	0,483	0,006		1,501	0,144

Die Effekte von den Kovariablen Harnwegsinfekt, Harntransportstörung, Wundheilungsstörung sowie Geschlecht und Alter sind nicht signifikant ($p > 0,05$). Der Einfluss von Alpha-1-Antitrypsin auf die Rejektion konnte als statistisch signifikant ermittelt werden ($p = 0,014$).

5 DISKUSSION

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob mit Hilfe von spezifischen Proteinmustern im Urin, welche zum Zeitpunkt der bioptischen Sicherung einer Abstoßung definiert wurden, die Vorhersage einer Rejektion anhand von postoperativ gewonnenen Urinproben möglich ist. Zudem sollten relevante Kandidatenproteine, welche sich zur Unterscheidung von Patienten mit Rejektion und ohne Rejektion eignen, identifiziert und validiert werden.

Diese Untersuchung wurde realisiert, indem zunächst mit der SELDI-TOF-MS relevante Proteinpeaks ermittelt und zu einem Vorhersagemodell kombiniert wurden, um dieses dann bioinformatisch auszuwerten und die Genauigkeit des Modells zu überprüfen. Die Reproduzierbarkeit sollte dann anhand eines unabhängigen Testsets kontrolliert werden. Des Weiteren wurden die Patientenproben mittels Multiplex-2D-Gelelektrophorese analysiert, um relevante Proteine zu ermitteln, anhand derer eine Unterscheidung zwischen den beiden Gruppen „mit Rejektion“ und „ohne Rejektion“ möglich ist. Es konnten einige Kandidatenproteine mittels MALDI-TOF-MS und durch die anschließende Datenbankanalyse identifiziert werden. Im letzten Schritt konnte einer dieser Kandidaten mit einem ELISA-Test quantifiziert werden und die klinische Anwendbarkeit dieses potentiellen Biomarkers wurde durch eine statistische Auswertung überprüft.

5.1 Urine und Serum als Analysematerial

Zur Etablierung einer minimal-invasiven Diagnosemethode zur frühzeitigen Vorhersage einer Rejektion nach einer Nierentransplantation würden sich prinzipiell sowohl Serum als auch Urin eignen. Beide Möglichkeiten stellen im Vergleich zum Goldstandard Biopsie eine erheblich geringere Belastung für den Patienten dar und wären ohne großen Aufwand beliebig oft wiederholbar.

Aufgrund der Zirkulation des Blutes durch den gesamten Körper wird Serum bereits bei bestimmten Fragestellungen untersucht. Prinzipiell wäre auch die Suche nach neuen Biomarkern, neben dem derzeit schon verwendeten Kreatinin, damit möglich. Jedoch weist Serum den Nachteil auf, dass Albumin ca. 50 % des gesamten Proteingehalts ausmacht und in seiner Funktion als Transportprotein verschiedenste Proteine bindet. Dadurch werden diese meist niedermolekularen und z.T. gering konzentrierten Proteine überlagert und können in einer Analyse nicht erfasst werden. Auch sind vielfältigste Veränderungen bezüglich des Expressionsmusters zu diesem frühen postoperativen Zeitpunkt, welcher in den Experimenten

untersucht wurde, durch die OP und die eingesetzte Immunsuppression zu erwarten. Aufgrund dessen könnten ebenfalls mögliche Rejektionsmarker überdeckt werden.

Auch Urin besitzt das Potential, Aussagen über pathologische Prozesse wiederzuspiegeln. Das Blut wird in der Niere glomerulär und tubulär filtriert, dabei entsteht der Primärharn. Dieser wird zu 99 % rückresorbiert und der restliche Anteil verlässt als Endharn die Niere und wird über den Urogenitaltrakt ausgeschieden. Die Niere filtriert damit sowohl Proteine aus dem Blut als auch Proteine und Zellen aus renalen Strukturen. Durch diesen engen Kontakt zu den Strukturen der Niere eignet sich Urin sehr gut, um Störungen im Organ bzw. im Transplantat zu reflektieren. Der Proteingehalt ist im Vergleich zum Serum bedeutend geringer und der glomeruläre Filter sorgt bei intakter Funktion dafür, dass nur Proteine bestimmter Größe diesen passieren können und ausgeschieden werden. Bezüglich des Einsatzes als Analysematerial stellt das einen Vorteil gegenüber dem Serum dar. Jedoch sind die Eigenschaften des Urins stark abhängig von der Funktion des Organs und auch der Trinkmenge des Patienten. Somit sind die Proben sehr variabel und heterogen.

5.2 Ermittlung eines spezifischen Proteinmusters im Urin mittels SELDI-TOF-MS zur Vorhersage einer Rejektion nach Nierentransplantation

Mit Hilfe der SELDI-TOF-MS Technologie unter Verwendung von CM10- und Q10-ProteinChip®-Arrays und einer anschließenden Auswertung in der bioinformatischen Software XL-Miner 3.5 konnten hochreproduzierbare Ergebnisse erbracht und ein Modell erstellt werden, welches sich als zuverlässig bei einer Vorhersage der Rejektion anhand von Urinen erwies, die zum Zeitpunkt der bioptischen Sicherung der Abstoßung entnommen wurden.

Danach wurde überprüft, ob mit diesem Regelmodell auch eine Vorhersage bezüglich einer Abstoßung an kurz nach der OP entnommenen Proben (1. – 10. postoperativer Tag) möglich wäre. Dabei wurde die vierkonditionale Regel der Patientengruppe „ohne Rejektion“ des Vorhersagemodells angepasst, um eine maximale Spezifität zu erreichen. Da die Sensitivität mit 57,7 % gering ausfiel, wurden die Patientenproben mit Rejektion daraufhin bezüglich ihres Abstoßungszeitpunktes genauer geprüft. Dabei fiel auf, dass die falsch negativen Patientenproben Abstoßungszeitpunkte aufwiesen, die mehrere Monate bis Jahre nach der OP lagen. Da die untersuchten Proben bereits kurz nach der NTX entnommen wurden und das Modell anhand von bioptisch gesicherten Proben erstellt wurde, erschien es sinnvoll, das Vorhersagemodell nur bei Urinen anzuwenden, bei denen kurz nach der Entnahme eine

Rejektion stattfand. Für die weitere Auswertung wurde daher für den Zeitraum vom Entnahmezeitpunkt der Probe bis zur Abstoßung eine Spanne von bis zu 30 Tagen festgelegt. Die Proben mit einem größeren Abstand wurden von der Auswertung ausgeschlossen und die Vorhersagefähigkeit des Regelmodells wurde nochmals überprüft. Mit dieser zeitlichen Einschränkung konnte eine Steigerung der Sensitivität des Modells auf 72,73 % erreicht werden, bei einer Spezifität von 84,6 %.

Diese hochsensitiven und reproduzierbaren Ergebnisse der postoperativ entnommenen Urinproben zeigen, dass die Vorhersage einer frühen Rejektion durch die Proteinanalyse im Urin möglich scheint. In diesen Untersuchungen konnte belegt werden, dass Urin sich bereits wenige Tage nach der OP eignet, um Patienten mit pathologischen Veränderungen am Transplantat mit guten Vorhersagewerten herauszufiltern.

Außerdem wurden in unserer Arbeitsgruppe ähnliche Untersuchungen bezüglich des Vorhersagepotentials von postoperativen Serumsproben durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass zu diesem frühen postoperativen Zeitpunkt im Serum noch keine eindeutige Aussage gemacht werden kann, wie dies anhand der Urinproben möglich ist. Das kann mit der bereits erwähnten Maskierung der zur Unterscheidung relevanten Proteine durch andere Serumsbestandteile wie Albumin bzw. durch eine Überlagerung der Biomarker durch die kurz nach der OP im Blut vorhandenen Entzündungsparameter erklärt werden.

Folglich scheint Urin sehr gut zur Analyse von Proteinen und somit zur Vorhersage einer frühzeitigen Abstoßungsreaktion geeignet zu sein.

Ähnliche Untersuchungen zur akuten Abstoßungsreaktion nach NTX stammen von Clarke et al. Es wurden dafür ebenfalls Urinproben von Patienten mit akuter Rejektion (n = 17) und Patienten ohne Rejektion (n = 15) mittels SELDI-TOF-MS (IMAC30, H4) analysiert und verglichen. Jedoch wurde bewusst auf die Einbeziehung von frühen Proben (< 4. Tag nach der OP) in der Analyse verzichtet, weil die Annahme vertreten wird, dass die Präsenz von den kurz nach der NTX verstärkt exprimierten inflammatorischen Proteinen die Untersuchung stören könnte. Es wurden 45 differenzierende Kandidatenbiomarker gefunden, u.a. bei 6,5 kDa, 6,7 kDa, 6,6 kDa, 7,1 kDa und 13,4 kDa. Es wurden die Proteinkandidaten mit einer Masse von 10,0 kDa und mit 3,4 kDa für die Analyse des Trainingssets genutzt. 91 % der Proben konnten korrekt zugeordnet werden, bei einer Sensitivität von 83 % und einer Spezifität von 100 %. Es wurde jedoch bei der Untersuchung mit einer geringen Patientenzahl gearbeitet und es fehlt eine Überprüfung der Ergebnisse an einem unabhängigen Testset. Außerdem liegen viele der ermittelten Peaks eng beieinander, was an einer Chip- bzw. einer

Spotvariation oder an einer Variation des bei den einzelnen Messungen verwendeten Lasers liegen könnte. Es wurde ebenfalls in der Publikation darauf verzichtet, die ermittelten Peaks zu identifizieren.

Auch ein Jahr später wurde eine ähnliche Arbeit von O’Riordan et al. durchgeführt. In der Veröffentlichung wurden mit vier verschiedenen Chiptypen (H50, Q10, CM10, IMAC30) mittels SELDI-TOF-MS 23 Urinproben mit Rejektion und 22 Proben im klinisch stabilen Zustand untersucht. Die Urine wurden zum Zeitpunkt der Diagnose der Rejektion oder in einer der klinischen Verlaufskontrollen gewonnen. Bei dem Vergleich von akuten Rejektionen mit den stabilen Patientenproben wurden folgende relevante Molekulargewichte beschrieben: 2.003 Da, 2.8026 Da, 4.7563 Da, 6.9906 Da, 19.0188 Da und 25.6657 Da. Jedoch wurden die Daten ebenfalls nicht noch einmal an einem unabhängigen Testset überprüft.

Der Vergleich dieser Arbeiten zeigt, dass durch die Verwendung unterschiedlicher ProteinChip®-Arrays bereits Proteinmassen zur Unterscheidung ermittelt werden konnten. Jedoch wurden die Kandidaten nicht identifiziert und auf ihr Potential als Biomarker überprüft. Zu unseren Ergebnissen konnten daher keine Übereinstimmungen gefunden werden, was durch die geringe Größe der untersuchten Proben und die Verwendung unterschiedlicher ProteinChip®-Arrays bedingt sein könnte. Bei Untersuchung größerer Testsets und weiteren Analysen könnten sich möglicherweise Parallelen zu unseren Ergebnissen aufzeigen.

Insgesamt nimmt die Methode der Surface-enhanced Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass spectrometry eine wichtige Rolle in der Proteomforschung zur Identifizierung und Charakterisierung neuer Biomarker ein. Auch die Differenzierung unterschiedlicher Patientengruppen ist mit anschließenden bioinformatischen Analysen möglich. Die Ergebnisse dieser Arbeit und weitere Publikationen konnten zeigen, dass die SELDI-TOF-MS durch die Identifizierung von Proteinmustern im Urin die Vorhersage einer Rejektion nach Nierentransplantation ermöglicht. Durch die Verwendung von spezifischen Oberflächen wird die Komplexität der Probe reduziert. Es wird dabei angenommen, dass bei gleichmäßiger Verteilung der Probe auf dem Spot die Signalintensitäten mit den relativen Proteinkonzentrationen korrelieren. Insgesamt besteht der große Vorteil im Vergleich zu anderen Methoden in der hohen Sensitivität, in dem geringen Probeneinsatz und in der guten Auflösung, v.a. bei Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht (< 20 kDa).

Aufgrund dieser ersten vielversprechenden Ergebnisse sollte in weiterführenden Untersuchungen das Testset vergrößert werden, um die Aussagefähigkeit zu verstärken. Auch

könnte anhand von geeignetem Probenmaterial überprüft werden, ob dieses Proteinprofil zur Verlaufskontrolle geeignet wäre, um eine Rejektion in den nachfolgenden 30 Tage zu erkennen. Jedoch sollte dabei stets die Kombination von verschiedenen relevanten Proteinen in einem Vorhersagemodell anzustreben, da einzelne Proteinmassen bzw. identifizierte Kandidaten nicht ausreichen werden, um so einen komplexen Prozess wie die frühzeitige Abstoßung eines Nierentransplantates in seiner Ganzheit vorherzusagen.

In einer weiteren Untersuchung wurde ebenfalls überprüft, ob mit Hilfe einer Regelbasis, welche im Vergleich zum bisher angewandtem Modell anhand von postoperativen Proben erstellt wurde, eine Optimierung der Sensitivität und Spezifität der Vorhersage für den Zeitraum von 30 Tagen erbringen kann. Mit Hilfe der Software XL-Miner 3.5 wurde ein neues Vorhersagemodell erstellt und auf das Trainingsset angewendet. Es wurde eine Sensitivität von 85,71 % und eine Spezifität von 78,57 % ermittelt. Des Weiteren wurde die Untersuchung an einem unabhängigen Testset überprüft. Hier konnte eine Sensitivität von 76,92 % und eine Spezifität von 69,23 % erzielt werden.

Insgesamt zeigte sich jedoch keine deutliche Verbesserung durch dieses neue Vorhersagemodell, welches ausschließlich anhand von postoperativen Proben erstellt wurde. Das könnte daran liegen, dass die verstärkten Inflammation zu diesem postoperativen Zeitpunkt der Proben zu Artefakten in der Untersuchung führt, wie dies bereits von Clarke et al. angemerkt wurde.

Eine weitere Frage, die sich im Laufe der Untersuchungen ergab, war, ob ein solches Vorhersagemodell auch die Art der Rejektion, ähnlich wie bei der Biopsie, klassifizieren kann. Die Frage wäre in sofern von Interesse, da bei den Rejektionsarten in den Leitlinien der Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) - Transplant Work Group und auch in den Leitlinien der European Association of Urology (EAU) unterschiedliche Therapieprinzipien empfohlen werden.

Diesbezüglich wurde mittels der SELDI-TOF-MS und einem neu erstellten Regelmodell überprüft, ob die Vorhersage einer vaskulären bzw. einer interstitiellen Rejektion möglich ist. Außerdem wurde untersucht, ob eine Verbesserung in der Unterscheidung zwischen Rejektion und Nicht-Rejektion erzielt werden kann, wenn man die jeweilige Rejektionsart mit den Patienten ohne Rejektionen vergleicht.

Dabei kamen wir zu dem Schluss, dass eine Unterscheidung der Proteinexpression zwischen einer interstitiellen und einer vaskulären Rejektion anhand der Proteinexpression möglich ist,

jedoch lag das Signifikanzlevel bei nur 0,6. Aufgrund der geringen Probenzahl, sollte in weiterführenden Untersuchungen das Probenet erweitert werden, um genauere Aussagen über das Potential des Vorhersagemodells zu treffen.

Vergleicht man postoperative Urine von Patienten mit interstitieller Rejektion und von Patienten ohne Rejektion, entsteht bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,8$ ein Vorhersagemodell mit einer Sensitivität von 83,3 % und einer Spezifität von 100 %. Hierbei konnte das Protein mit einer Masse von 76.517 Da bei Patienten mit interstitieller Rejektion als herunterreguliert und bei Patienten mit stabiler Rejektion als hochreguliert vorgefunden werden. Außerdem konnten die Massen 2.983 Da und 75.136 Da bei interstitieller Rejektion und die Proteinmassen 101.037 Da und 60.622 Da bei stabiler Transplantatfunktion beschrieben werden.

In Hinblick auf die Analyse zur Unterscheidung „mit Rejektion“ gegen „ohne Rejektion“ des Gesamtkollektivs konnte jedoch keine Übereinstimmung der relevanten Massen zu dieser Untersuchung gefunden werden. Diese ersten Ergebnisse müssen jedoch auf Grund der geringen Patientenzahlen und der fehlenden Validierung anhand eines unabhängigen Testsets noch vertieft werden, um die Vorhersagegenauigkeit zu überprüfen.

Bei der Gegenüberstellung der vaskulären Rejektionspatienten und der Patienten mit einer stabilen Transplantatfunktion konnte kein zuverlässiges vierkonditionales Vorhersagemodell erstellt werden. Ein Grund dafür könnte ebenfalls die geringe Zahl an vaskulären Rejektionen ($n = 4$) sein. Die Untersuchung sollte daher gegebenenfalls mit einer größeren Anzahl an Patientenproben wiederholt werden, um die Tauglichkeit einer solchen Regelbasis einschätzen zu können.

5.3 Vergleich des Proteinmusters im Urin mittels Multiplex-2D-Gelelektrophorese und Identifizierung von Kandidatenproteinen mittels PMF

Da bei der SELDI-TOF-MS nur eine präzise Auflösung in den kleineren Molekulargewichtsbereichen erreicht werden kann, sollten die Patientengruppen zudem in einer Multiplex-2D-Gelelektrophorese miteinander verglichen.

Hierzu wurde zunächst eine 2D-PAGE als Vorversuch durchgeführt. Durch die Kombination der beiden orthogonalen Auftrennungstechniken kann ein Gesamtüberblick über die im Medium vorhandenen Proteine erlangt und somit eine höhere Auflösung über einen weiten Molekulargewichtsbereich erreicht werden. Jedoch ist die Sensitivität zur Detektion von

gering konzentrierten und niedermolekularen Proteinen nicht ausreichend. Die Stärke dieser Methoden liegt vor allem im Bereich der höheren Molekularmassen. Folglich ergänzen sich die Verfahren der SELDI-TOF-MS und die 2D-Gelelektrophorese in ihrem Analysebereich. Die Kombination von 2D-PAGE und Massenspektrometrie stellt ein bewährtes Verfahren zur Charakterisierung von Proteinmustern und der Identifizierung einzelner Proteine dar.

In dem vorangestellten Versuch wurde die gute Qualität der Auftrennung am Beispiel einer Urinprobe mit Rejektion gezeigt. Das Proteinmuster wies eine für Urin charakteristische Verteilung auf, die in entsprechenden Arbeiten ebenso dargestellt wurde.

Anschließend folgte die Multiplex-2D-Gelelektrophorese. Dieses Verfahren bietet im Gegensatz zur 2D-PAGE eine Reihe von Vorteilen bezüglich unseres Untersuchungsansatzes. Im Vergleich zur konventionellen 2D-PAGE, bei der jeweils eine Probe in einem Gel aufgetrennt wird, kann bei der Multiplex-2D-Gelelektrophorese ein Gel mit mehreren Proben beladen werden. Da die Auftrennung dieser Proben im selben Gel und unter exakt gleichen Laufbedingungen durchgeführt wird, können direkte Vergleiche angestellt werden. Des Weiteren ermöglicht die Markierung definierter Proteinmengen mit bestimmten Konzentrationen unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe den quantitativen Vergleich der untersuchten Proben. Die hohe Sensitivität der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen schon kleinste Proteinmengen detektiert werden können, stellt einen weiteren Vorteil dar.

Für die Durchführung der Multiplex-2D-Gelelektrophorese wurde zunächst die Proteinkonzentration in den Proben mittels Bradford-Test bestimmt. Der Vorteil dieses Verfahrens für die Praxis besteht v.a. in der einfachen Handhabung und der schnellen Farbentwicklung. Ein Nachteil ist jedoch, dass es durch das saure Milieu, welches nötig ist, zur Ausfällung von Proteinen kommen kann, was wiederum die Anwendung stört.

Bei der Auswertung fiel auf, dass sich die Gesamtproteinkonzentrationen sowohl innerhalb der Rejektionsgruppe als auch zwischen der Gruppe „mit Rejektion“ und „ohne Rejektion“ stark unterschieden, so dass je nach Probe unterschiedliche Verdünnungsreihen nötig waren, damit die Verdünnungskonzentration zur Auswertung im Bereich der Eichkurve lag. Diese Erkenntnisse konnten im Verlauf auch statistisch mit Hilfe der Software SPSS 19.0 als signifikant bestätigt werden.

Anschließend wurden gleiche Proteinmengen von jeweils 9 Proben aus den zwei Gruppen „mit Rejektion“ und „ohne Rejektion“ gepoolt. Es wurden technische Replikate angefertigt indem beide Pools sowohl mit dem einen als auch mit dem anderen verwendeten

Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. Dadurch kann man sicherstellen, dass die später detektierten Unterschiede im Expressionsmuster nicht durch die unterschiedlichen Signalstärken der genutzten Farbstoffe bedingt sind, sondern es sich um biologische Unterschiede handelt. In der softwaregestützten Auswertung der Gele konnten insgesamt 1020 Spots detektiert werden, von denen 401 unterschiedlich exprimiert in den beiden Gruppen vorlagen. Die Auswahl von Kandidatenproteinen wurde mit folgenden Kriterien verfeinert: Zum einen müssen die Unterschiede signifikant sein ($p < 0,05$) und zum anderen müssen die Proteine mindestens 2-fach hoch- oder herunterreguliert sein. Dieser Anforderung entsprachen 117, wobei bei der Gruppe mit Rejektion 62 Spots hochreguliert und 55 Spots herunterreguliert vorlagen. Es gelang insgesamt 28 Spots zu picken und mittels Peptide Mass Fingerprinting (PMF) zu ermitteln.

Diese Methode konnten bereits in anderen Veröffentlichungen erfolgreich zur Ermittlung von Kandidatenproteinen im Urin für bestimmte urologische Erkrankungen genutzt werden.

In der Arbeit von Banon-Maneus et al. wurde eine Analyse von Urinproben mit einer 2D-DIGE bezüglich CAD (Chronic Allograft Dysfunction) durchgeführt. Hier wurden Patienten ohne CAD und mit stabiler Transplantatfunktion zunächst in einer 2D-PAGE aufgetrennt und als zweiter Teilversuch in einer 2D-DIGE drei Gruppen von CAD-Patienten gegeneinander in insgesamt drei Gelen verglichen, wobei immer zwei Proben einer Gruppe gepoolt gegen den Pool einer anderen Gruppe aufgetragen wurden. Mit der 2D-DIGE konnten insgesamt 31 differenziell exprimierte Proteine gefunden werden. Bei dem Vergleich mit der zuvor angefertigten 2D-PAGE konnten 22 der relevanten Proteine wieder aufgefunden werden.

In einer weiteren Publikation konnte durch Orenes-Pinero et al. die 2D-DIGE an Urinproben erfolgreich zur Unterscheidung von Patienten mit Blasenkarzinom und gesunden Probanden eingesetzt werden. In einem ähnlichen Versuchsaufbau wurden dazu 14 Patientenproben gegeneinander auf sieben Gelen verglichen. Es konnten so 12 differenziell exprimierte Spots beschrieben werden. Diese wurden aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels MALDI-TOF-MS und der MASCOT-Datenbank identifiziert. So konnten insgesamt fünf differenziell exprimierte Proteine identifiziert werden, die signifikant ($p < 0,05$) eine Unterscheidung von Patienten mit Blasenkarzinom möglich machen und als potentielle Biomarker geeignet wären. Es erfolgte allerdings keine Validierung der Ergebnisse.

Aus diesen publizierten Ergebnissen kann in Übereinstimmung mit unseren eigenen Daten belegt werden, dass die Multiplex-2D-Gelelektrophorese ein hohes Potential besitzt,

Unterschiede zwischen Patientengruppen zu detektieren und somit Hinweise auf einen möglichen pathologischen Prozess zu geben. In unserem Fall konnten signifikante Unterschiede in der Proteinexpression im Urin nach Nierentransplantation dargestellt werden, welche als Grundlage für die Identifizierung der Kandidatenproteine und weiterführende Analysen genutzt wurden.

Anschließend an die Visualisierung der Expressionsmuster mit Coomassie G-250 wurden die von der Software Delta2D 4.2 ermittelten relevanten Proteinspots ausgestochen. Für das Peptide Mass Fingerprinting wurde ein In-Gel-Verdau der 28 gepickten Spots mit der Protease Trypsin durchgeführt. Diese spaltet Proteine spezifisch am Carboxylende der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin in Peptidfragmente. Unter Verwendung der MALDI-TOF-MS wurden die Molekulargewichte der entstandenen Peptide bestimmt und mit der MASCOT-Datenbank ausgewertet. Dabei konnten drei Proteine, die besonders hohe Expressionsunterschiede zwischen den Patientengruppen mit und ohne Rejektion aufwiesen, erkannt werden. Es handelt sich dabei um Alpha-1-Antitrypsin, welches in der Untersuchung 11- bis 12-fach erhöht bei den Patienten mit Rejektion vorlag, sowie Transferrin (2,8-fach erhöht) und Haptoglobin (2,2-fach erhöht). Außerdem konnte bestätigt werden, dass Albumin auch im Urin unter Umständen die Auswertung stören könnte. Es wurde in vielen Spots ermittelt, d.h. das Protein, welches gebunden am Albumin vorliegt, wurde überlagert und konnte so nicht identifiziert werden.

Auch andere Publikationen konnten bereits in den letzten Jahren verschiedene Kandidaten bezüglich der Vorhersage einer akuten Rejektion nach NTX beschreiben. Hierbei sind beispielhaft das Protein Beta-2-Mikroglobulin oder das Beta-Defensin sowie das Beta-1-Antichemotrypsin im Urin bei akuter Rejektion zu nennen. Jedoch wurde keiner der publizierten potentiellen Marker in der klinischen Praxis etabliert.

Es handelt sich in den meisten Fällen um Akut-Phase-Proteine. Das erscheint schlüssig, da es sich bei der Rejektion um eine Entzündungsreaktion bzw. eine starke Immunreaktion des Spenders auf das Empfängerorgan handelt. In der Auswertung zeigte sich das Protein Alpha-1-Antitrypsin im Urin von Patienten bereits frühzeitig (3. – 5. postoperativer Tag) mehr als 11-fach erhöht, wobei die Diagnose mittels Biopsie erst mit einer zeitlichen Verzögerung gestellt werden konnte. Das bestätigt den Ansatz, dass die Anwendung von Biomarkern zu einer frühen Diagnosestellung beitragen sowie die derzeitigen, relativ

unspezifischen klinischen Parameter ergänzen könnten und somit eine frühe Therapie in der klinischen Praxis ermöglichen würden.

5.4 Validierung und statistische Auswertung des Kandidatenproteins

Alpha-1-Antitrypsin

Das Verfahren des gepoolten Auftrags von Proben in der Multiplex-2D-Gelelektrophorese kann zu Expressionsunterschieden basierend auf einzelnen „Ausreißern“ führen.

Dafür wurde zunächst ein Western Blot für die Proteine Alpha-1-Antitrypsin und für das Haptoglobin angefertigt. Hiermit konnte durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern gezeigt werden, dass die Spots im Gel wieder aufzufinden sind und es wurde die Lokalisation der Proteine im Vergleich zum Fluoreszenzgel überprüft werden. Außerdem können damit Isoformen, natürliche Varianten und posttranslationale Modifikationen (PTM) detektiert werden. Das hat besondere Bedeutung, weil damit pathologische Veränderungen assoziiert sein können. Durch diesen Western Blot von 2D-Gelen sind somit semiquantitative Analysen dieser Proteinvariationen zwischen den Patientengruppen möglich.

Zudem sollte die Konzentration der Kandidatenproteine bestimmt werden, da die gruppenspezifischen Expressionsunterschiede auch durch das Poolen von Proben in der Multiplex-2D-Gelelektrophorese kommen könnten. Diese würden dann auf den starken Schwankungen der Absolutkonzentration dieser Proteine in einzelnen Proben basieren und so das Ergebnis verfälschen.

Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde für eines der Kandidatenproteine eine Quantifizierung im Urin unter Verwendung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) durchgeführt. Die Konzentration von Alpha-1-Antitrypsin wurde in den 18 Proben gemessen, die für die Multiplex-2D-Gelelektrophorese verwendet wurden, und zudem noch an weiteren 13 postoperativen Proben (vom 9. postoperativen Tag).

Das Protein Alpha-1-Antitrypsin (AAT) konnte dabei in den einzelnen Urinproben nachgewiesen und dessen differenzielle Expression bestätigt werden. Der Mann-Whitney-U-Test ergab zunächst keine signifikant höhere AAT-Konzentration in den Urinproben der Rejektions-Gruppe. Somit wurde deutlich, dass eine Unterscheidung zwischen „mit Rejektion“ und „ohne Rejektion“ mit Hilfe der Absolutkonzentration des Kandidatenproteins AAT nicht möglich war. Es fiel jedoch auf, dass die AAT-Konzentrationen in den Urinen sehr verschieden war. Auch im vorangegangenen Bradford-

Test zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration war eine große Heterogenität auffällig. Hier bestätigt sich die Annahme, dass Urin zwar ein gutes Potenzial als Untersuchungsmaterial besitzt, jedoch die Proteinkonzentration im Urin sehr variabel und von verschiedenen Faktoren wie der Flüssigkeitszufuhr oder der Funktion des transplantierten Organs abhängig ist. Dieser Unterschied in der Gesamtproteinkonzentration erwies sich in der SPSS-Analyse als signifikant ($p = 0,04$). Aufgrund der beobachteten Heterogenität der Urinproben erschien es schlüssig, dass in einer Probe mit geringem Gesamtproteingehalt nicht die gleiche absolute Menge an Alpha-1-Antitrypsin vorhanden sein könnte, wie bei einem Patienten, der insgesamt eine größere Proteinmenge im Urin aufwies. Daher wurde die Variable der signifikant unterschiedlichen Gesamtkonzentration in die Auswertung miteinbezogen. Die statistische Analyse wurde erneut durchgeführt, indem das Verhältnis der AAT-Konzentration zur Gesamtproteinkonzentration untersucht wurde. Im Hypothesentest zeigte sich, dass eine signifikante Unterscheidung zwischen den Gruppen „mit Rejektion“ und „ohne Rejektion“ möglich ist ($p = 0,023$).

Für dieses Verhältnis wurde daraufhin statistisch ein Cut-off-Wert festgelegt. Dazu wurde mit SPSS 19.0 eine ROC-Kurve angefertigt ($AUC = 0,743$) und das Verhältnis von 0,4373 unter Verwendung des Youden-Index ausgewählt (Sensitivität = 100%, Spezifität = 47%). Anhand dessen wurde in einer Vierfeldertafel der positive und negative prädiktive Wert berechnet.

Es konnte ermittelt werden, dass bei 66 % der Patienten, die mittels des [AAT]:[Gesamtprotein]-Verhältnisses als „mit Rejektion“ zugeordnet wurden, tatsächlich eine Rejektion (mittels Stanzbiopsie diagnostiziert) vorlag. Bei der Gruppe „ohne Rejektion“ lag das Verhältnis bei 100 % der Urinproben über 0,4373, sodass die Patienten korrekt der Gruppe ohne Abstoßungsreaktion zugeordnet werden konnten.

Somit korreliert das Verhältnis von AAT zur Gesamtproteinmenge mit einer stattfindenden Abstoßungsreaktion nach einer Nierentransplantation. Außerdem konnte eine signifikante Erhöhung der Proteinkonzentration bei den Patienten mit Rejektion statistisch belegt werden.

Weitergehend sollten diese Untersuchungen auf den AAT-Gehalt im Urin an einer größeren Zahl postoperativer Proben (mit und ohne Rejektion) fortgeführt werden, um ihn als Marker zu validieren. Außerdem sollte die Alpha-1-Antitrypsin-Konzentration bzw. das Verhältnis aus [AAT]:[Gesamtproteinmenge] im Urin als Verlaufsparemeter untersucht werden. Es könnte auch eine ergänzende Untersuchung zur Konzentration des Proteins im Serum durchgeführt werden.

Bei der Suche nach neuen Biomarkern besteht eine weitere Herausforderung darin, dass dieser Marker tatsächlich spezifisch für die Erkrankung, wie in unserem Fall für die Abstoßungsreaktion, ist. Deshalb sollten weitere klinische Parameter analysiert werden. Hierzu wurden Informationen bezüglich aufgetretener Harnwegsinfekte, Wundheilungsstörungen und Harntransportstörungen in den Tagen nach der OP analysiert. Außerdem wurde der Einfluss von Patientenalter und Geschlecht untersucht.

Mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Effekte von Harnwegsinfekt, Harntransportstörung, Wundheilungsstörung sowie Geschlecht und Alter nicht signifikant ($p > 0,05$) sind, d.h. dass das beschriebene Verhältnis aus AAT- zur Gesamtproteinkonzentration nicht von diesen Faktoren beeinflusst wird, sondern mit der Rejektion in Zusammenhang steht ($p = 0,014$).

5.5 Die Kandidatenproteine Alpha-1-Antitrypsin, Haptoglobin und Transferrin

Das Protein Alpha-1-Antitrypsin (AAT) besteht aus 418 Aminosäuren und bildet in seiner funktionellen Form Homodimere. Es sind 3 Isoformen bekannt. Es zählt zu den Akut-Phase-Proteinen und wird vorrangig in der Leber und dem Gefäßbett produziert. Es handelt sich um einen Serinprotease-Inhibitor, welcher u.a. Elastase, Trypsin, Chymotrypsin, und Kollagenasen inhibiert. Bekannt ist das Protein v.a. durch den genetisch bedingten Alpha-1-Antitrypsinmangel. Bei der dabei auftretenden Herunterregulation des Proteins entfällt seine inhibierende Funktion und Elastasen können ungehindert das Binde- und Parenchymgewebe der Lunge angreifen, was wiederum zu Komplikationen führt, z.B. zu einem progredienten Lungenemphysem. (Datenbank UniProtKB/Swiss-Prot) Aber auch von einer Hochregulation dieses Proteins im Zusammenhang mit verschiedenen Nierenerkrankungen wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen berichtet.

So konnte in der Untersuchung des Urinproteoms bei Patienten mit diabetischer Nephropathie von Sharma et al. und Rao et al. eine Hochregulation von AAT im Urin aufgezeigt werden. Sharma et al. verglichen Urine von drei Patienten mit einer gesunden Urinprobe in einer Multiplex-2D-Gelelektrophorese. Außerdem wurde eine ELISA Analyse sowie eine immunhistologische Untersuchung von Nierengewebe angeschlossen. Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe Rao et al. gestalteten sich ähnlich. Hier konnten insgesamt 65 Proteine als signifikant unterschiedlich bei Patienten mit diabetischer Nephropathie ermittelt werden.

In beiden Arbeiten konnte ebenfalls das Alpha-1-Antitrypsin als Protein zur Erkennung von Patienten mit diabetischer Nephropathie beschrieben werden.

Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe Kwak et al. in ihrer Analyse zur IgA-Nephropathie anhand von Urin und Nierengewebe mit Hilfe einer 2D-PAGE sowie anschließender MALDI-TOF-MS, Western Blot und einer immunhistochemischen Untersuchung ebenfalls AAT als ein hochreguliertes Protein bestimmen, welches in die Pathogenese der glomerulären Destruktion unter Beteiligung von IgA-Molekülen involviert ist.

Neben dem Alpha-1-Antitrypsin waren auch die beiden Kandidatenproteine Haptoglobin und Transferrin in der Auswertung der MALDI-TOF-MS mit einer deutlich erhöhten Konzentration bei den Patienten mit Rejektion herausgestochen. Zu diesem Proteinen konnten ebenfalls Informationen in der Datenbank UniProtKB/Swiss-Prot gefunden werden.

Bei dem Kandidaten Transferrin handelt es sich um das vierthäufigste Plasmaprotein im Blutplasma. Es ist bekannt für seine Hauptfunktion der Eisenbindung und es wird hauptsächlich von der Leber produziert, u.a. aber auch zu kleinen Teilen von der Niere.

Haptoglobin ist ein Transportprotein im Blutplasma und zählt zur Gruppe der Akut-Phase-Proteine. Es bindet Hämoglobin, um es zur Milz zu transportieren, wo es abgebaut wird. Zudem verhindert es einen Eisenverlust über die Niere und schützt diese vor der Schädigung durch Hämoglobin.

Auch diese beiden Proteine wurden bereits in Zusammenhang mit verschiedenen Nierenerkrankungen beschrieben.

So konnten Soler-Gracia et al. mit ihrer Arbeit ein erhöhtes Level an Haptoglobin, Transferrin und Alpha-1-Antitrypsin im Urin in der 2D-PAGE und MALDI-TOF-MS bei Kindern mit HIV-Nephropathie und HIV-assoziiertem hämolytisch urämischem Syndrom (HUS) nachweisen. Die Proteine Haptoglobin und Transferrin wurden zudem noch in einem ELISA validiert.

Auch Lafitte et al. konnten in einem Vergleich von 49 gesunden Probanden gegen 4 Patienten mit Nierenerkrankungen (diabetische Nephropathie, Proximale renal-tubuläre Azidose, IgG-Nephropathie, Nephrotisches Syndrom) in einer 2D-Gelelektrophorese differentielle Spots mit der Massenspektrometrie identifizieren. Diese gehörten zu 5 verschiedenen Proteinen. Dazu gehörten u.a. das Transferrin und das Haptoglobin. Die Studie konnte zeigen, dass das Proteinprofil der 4 untersuchten Patienten mit Nierenerkrankung in der 2D-PAGE charakteristisch für ihre Nierenerkrankung war.

Die Arbeitsgruppe Xu et al. untersuchte den Zusammenhang zwischen der hypertensiven Nephropathie und verschiedenen Urinproteinen, u.a. Transferrin. Die Untersuchung von 88 Urinproben mit einem ELISA-Test und einer anschließenden statistischen Auswertung mit SPSS ergab einen positiven Zusammenhang zwischen der Schwere des Stadiums der hypertensiven Nephropathie und der Ausscheidung von Urinproteinen.

Bereits 2009 wurde durch die Arbeitsgruppe von Das und Brunner et al. das Protein Transferrin als potenter Lupus nephritis (LN)- Biomarker erwähnt. In der aktuellen Veröffentlichung kommt die Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass verschiedene Urinmarker assoziiert sind mit spezifischen Gewebeveränderungen bezüglich Lupus nephritis. Es wurden für die Untersuchung 76 Urinproben von Patienten mit LN mit Hilfe von Assays auf verschiedene, im Zusammenhang mit der Erkrankung publizierte Urinbiomarker untersucht. Sie kamen u.a. zu dem Ergebnis, dass eine Kombination aus MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), AAG (Alpha-1-Acid Glycoprotein), Creatinine Clearance plus C4 und Transferrin ein guter diagnostischer Test für den membranösen Lupus nephritis darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Kandidatenprotein AAT mit Hilfe eines ELISA validiert. In aufbauenden Untersuchungen sollte ebenfalls eine Validierung und Quantifizierung von Haptoglobin und Transferrin erfolgen, damit eine Einschätzung des Potentials als möglicher Biomarker erfolgen kann. Es zeigte sich bereits beim Vergleich der Ergebnisse mit der aktuellen Literatur, dass diese Proteine bei Nierenerkrankungen auffällig im Urin vorliegen und auch als potentieller Biomarker für die akute Rejektion geeignet sein könnten.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass das Konzentrationsverhältnis aus Alpha-1-Antitrypsin und Gesamtprotein im Urin als Marker für die Vorhersage einer akuten Rejektion nach einer Nierentransplantation geeignet ist. Auch konnte gezeigt werden, dass die Expressionsänderung unabhängig von anderen klinischen Faktoren, wie einem Harnwegsinfekt oder Wundheilungsstörungen nach der OP, auftritt und auch nicht abhängig vom Alter oder Geschlecht des Patienten ist. Jedoch scheint Alpha-1-Antitrypsin als alleiniger Biomarker zur Diagnose einer Rejektion nicht geeignet, da es auch bei anderen Nierenerkrankungen erhöht vorliegt. Die Identifizierung weiterer Biomarker aus dem Urin könnte jedoch in Kombination mit dem potenziellen Kandidaten AAT eine frühzeitige Sicherung der akuten Rejektion ermöglichen.

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die akute Rejektion ist eine Komplikation, die nach einer Nierentransplantation auftreten kann und die Funktion des Transplantats sowie die Prognose des Patienten beeinflusst. Derzeit ist der Goldstandard für die Diagnose einer Rejektion die Biopsie, wobei dieses invasive Verfahren Komplikationen und Limitationen aufweist. Zudem ist eine solche Biopsie nicht beliebig oft wiederholbar. Die derzeit zur Verfügung stehenden klinischen Parameter sind jedoch ebenfalls nicht für eine frühzeitige Erkennung einer Abstoßung geeignet. Daher besteht die Notwendigkeit der Identifizierung von neuen, möglichst wenig invasiven Biomarkern.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Methoden aus der Proteomik entscheidend zur Identifizierung von Biomarkern, welche für eine frühzeitigen Vorhersage einer Rejektion geeignet sind, beitragen können.

Mit Hilfe der *SELDI-TOF-MS* konnte ein Proteinmuster identifiziert werden, welches zum Zeitpunkt der bioptischen Sicherung mit der Abstoßung korreliert. Es zeigen sich deutliche Expressionsunterschiede im Proteinprofil, die eine zuverlässige Korrelation zu einer Rejektion ermöglichen. Des Weiteren kann mit Hilfe dieses Proteinmusters auch in postoperativ entnommenen Urinproben eine korrekte Zuordnung zur Gruppe „mit Rejektion“ und „ohne Rejektion“ getroffen werden. Dies wurde anhand eines unabhängigen Testsets bestätigt. Insgesamt konnten hoch reproduzierbare Ergebnisse gewonnen werden. Eine frühe Rejektion ist also bereits wenige Tage nach Transplantation durch ein spezifisches Proteinmuster im Urin detektierbar. Zudem konnten erste Untersuchungen mit kleinen Patientenzahlen zeigen, dass mit Hilfe eines Expressionsmusters im Urin bereits zu einem frühen Zeitpunkt eine Aussage zur Art der Rejektion getroffen werden kann.

Mit der Durchführung einer *Multiplex-2D-Gelelektrophorese*, anschließender *MALDI-TOF-MS* und einer Datenbankauswertung konnte das Akut-Phase-Protein Alpha-1-Antitrypsin als Markerprotein zur Vorhersage von Abstoßungsreaktionen identifiziert werden. Durch Bestimmung des Verhältnisses aus $[AAT]:[Gesamtprotein]$ im Urin ist eine Zuordnung von „Abstoßung“ und „keine Abstoßung“ möglich. Der Einfluss von Faktoren wie Harnwegsinfekte, Harnstauung, Wundheilungsstörungen, Alter und Geschlecht konnte dabei ausgeschlossen werden.

Es sollte sich eine Validierung an einem größeren, unabhängigen Patientenkollektiv anschließen. Außerdem sollte geprüft werden, wie sich das ermittelte Verhältnis als Verlaufsparemeter für Rejektionen zu einem späteren Zeitpunkt eignet bzw. ob dieser Marker nur spezifisch in der postoperativen Phase auftritt.

Da das Protein Alpha-1-Antitrypsin auch bei anderen Nierenerkrankungen wie der IgA-Nephropathie und der diabetischen Nephropathie erhöht vorliegen kann, sollten weitere Biomarker identifiziert und validiert werden. Außerdem ist eine Kombination aus verschiedenen Rejektionsmarkern anzustreben.

Die Etablierung eines solchen Biomarker-Sets würde einen enormen Fortschritt bedeuten, da eine Verlaufskontrolle damit minimal-invasiv, beliebig oft wiederholbar und sehr engmaschig realisierbar wäre.

Literaturverzeichnis

- Banon-Maneus E, Diekmann F, Carrascal M, Quintana LF, Moya-Rull D, Bescos M, Ramirez-Bajo MJ, Rovira J, Gutierrez-Dalmau A, Sole-Gonzalez A, Abian J, Campistol JM. 2010. Two-dimensional difference gel electrophoresis urinary proteomic profile in the search of nonimmune chronic allograft dysfunction biomarkers. *Transplantation*, 89 (5):548-558.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Breidenbach T, Banas B, Hrsg. 2011. *Organspende und Transplantationsmedizin* XXS pocket. Grünwald: Boern Bruckmeier Verlag GmbH.
- Brosig W, Nagel R. 1966. Kidney transplantation. *Urol Int*, 21 (2):97-119.
- Brunner HI, Bennett MR, Mina R, Suzuki M, Petri M, Kiani AN, Pendl J, Witte D, Ying J, Rovin BH, Devarajan P. 2012. Association of noninvasively measured renal protein biomarkers with histologic features of lupus nephritis. *Arthritis Rheum*, 64 (8):2687-2697.
- Candiano G, Santucci L, Petretto A, Bruschi M, Dimuccio V, Urbani A, Bagnasco S, Ghiggeri GM. 2010. 2D-electrophoresis and the urine proteome map: where do we stand? *J Proteomics*, 73 (5):829-844.
- Clarke W, Silverman BC, Zhang Z, Chan DW, Klein AS, Molmenti EP. 2003. Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann Surg*, 237 (5):660-664; discussion 664-665.
- Das L, Brunner HI. 2009. Biomarkers for renal disease in childhood. *Curr Rheumatol Rep*, 11 (3):218-225.
- Deutsche Stiftung Organtransplantation, Hrsg. 2012. *Jahresbericht 2011 - Organspende und Transplantation in Deutschland*. Frankfurt/Main: Lindner & Steffen GmbH.
- Dihazi H, Muller GA, Lindner S, Meyer M, Asif AR, Oellerich M, Strutz F. 2007. Characterization of diabetic nephropathy by urinary proteomic analysis: identification

- of a processed ubiquitin form as a differentially excreted protein in diabetic nephropathy patients. *Clin Chem*, 53 (9):1636-1645.
- Engvall E, Perlmann P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8 (9):871-874.
- Eurotransplant International Foundation, Hrsg. 2011. Annual report 2011. Den Haag: Cip-Gegevens Koninklijke Bibliotheek.
- Frei U, Schober-Halstenberg HJ, Hrsg. 2006. Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantationen in Deutschland 2005-2006 Berlin: QuaSi-Niere gGmbH.
- Guild WR, Harrison JH, Merrill JP, Murray J. 1955. Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 67:167-173.
- Hutchens TW, Yip TT. 1993. New Desorption Strategies for the Mass-Spectrometric Analysis of Macromolecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 7 (7):576-580.
- Joo WA, Lee DY, Kim CW. 2003. Development of an effective sample preparation method for the proteome analysis of body fluids using 2-D gel electrophoresis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67 (7):1574-1577.
- Junker K, Stubendorff B, Pilchowski R, Ott U, Reichelt O, Wolf G, Schubert J, Steiner T. 2009. Protein Profiling in Serum and Urine from Patients with Rejection after Kidney Transplantation. *European Urology Supplements*, 8 (4):268-268.
- Karam G, Kälble T, Alcaraz A, F.T. A, Budde K, Humke U, Kleinclauss F, Nicita G, Olsburgh JO, Süsal C. 2009. EAU guidelines on renal transplantation. EAU Guidelines, edition presented at the 25th EAU Annual Congress, Barcelona 2010.
- Karas M, Hillenkamp F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, 60 (20):2299-2301.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. 2009. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*, 9 Suppl 3:S1-155.

- Klose J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 26 (3):231-243.
- Kuhlmann U, Walb D. 2008. *Nephrologie: Pathophysiologie- Klinik- Nierenersatzverfahren*. Thieme.
- Kwak NJ, Wang EH, Heo IY, Jin DC, Cha JH, Lee KH, Yang CW, Kang CS, Choi YJ. 2007. Proteomic analysis of alpha-1-antitrypsin in immunoglobulin A nephropathy. *Proteomics Clin Appl*, 1 (4):420-428.
- Lafitte D, Dussol B, Andersen S, Vazi A, Dupuy P, Jensen ON, Berland Y, Verdier JM. 2002. Optimized preparation of urine samples for two-dimensional electrophoresis and initial application to patient samples. *Clin Biochem*, 35 (8):581-589.
- Löffler G, Hrsg. 2003. *Basiswissen Biochemie : mit Pathobiochemie ; mit 125 Tabellen ; [neuer GK]. 5. , komplett überarb. und aktualisierte Aufl.* Berlin [u.a.]: Springer-Verlag.
- Mengel M, Sis B, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, Solez K, Cendales L, Demetris AJ, Drachenberg CB, Farver CF, Rodriguez ER, Wallace WD, Glotz D. 2012. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*, 12 (3):563-570.
- Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. 1958. Kidney transplantation between seven pairs of identical twins. *Ann Surg*, 148 (3):343-359.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. 2003. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*, 349 (24):2326-2333.
- O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250 (10):4007-4021.
- O'Riordan E, Orlova TN, Podust VN, Chander PN, Yanagi S, Nakazato M, Hu R, Butt K, Delaney V, Goligorsky MS. 2007. Characterization of urinary peptide biomarkers of acute rejection in renal allografts. *Am J Transplant*, 7 (4):930-940.
- O'Riordan E, Orlova TN, Mei JJ, Butt K, Chander PM, Rahman S, Mya M, Hu R, Momin J, Eng EW, Hampel DJ, Hartman B, Kretzler M, Delaney V, Goligorsky MS. 2004.

- Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*, 15 (12):3240-3248.
- Oetting WS, Rogers TB, Krick TP, Matas AJ, Ibrahim HN. 2006. Urinary beta2-microglobulin is associated with acute renal allograft rejection. *Am J Kidney Dis*, 47 (5):898-904.
- Orenes-Pinero E, Corton M, Gonzalez-Peramato P, Algaba F, Casal I, Serrano A, Sanchez-Carbayo M. 2007. Searching urinary tumor markers for bladder cancer using a two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) approach. *J Proteome Res*, 6 (11):4440-4448.
- Ott U, Wolf G. 2010. Indikation zur Nierenbiopsie. *Der Nephrologe* 6(5):466-472.
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al. 1999. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*, 55 (2):713-723.
- Rao PV, Lu X, Standley M, Pattee P, Neelima G, Girishesh G, Dakshinamurthy KV, Roberts CT, Jr., Nagalla SR. 2007. Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, 30 (3):629-637.
- Reichelt O, Pilchowski R, Muller J, von Eggeling F, Schubert J, Grone HJ, Ott U, Junker K. 2007. [Identification of rejection markers after kidney transplantation using protein chip technology]. *Urologe A*, 46 (9):1161.
- Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P. 1992. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 203 (1):173-179.
- Schaub S, Wilkins JA, Antonovici M, Krokhin O, Weiler T, Rush D, Nickerson P. 2005. Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. *Am J Transplant*, 5 (4 Pt 1):729-738.

- Sharma K, Lee S, Han S, Francos B, McCue P, Wassell R, Shaw MA, RamachandraRao SP. 2005. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis analysis of the urine proteome in human diabetic nephropathy. *Proteomics*, 5 (10):2648-2655.
- Siegenthaler W, Amann-Vesti BR, Hrsg. 2006. *Klinische Pathophysiologie : 239 Tabellen*. 9., völlig neu bearb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Georg Thieme Verlag.
- Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, Solez K, Baldwin WM, 3rd, Bracamonte ER, Broecker V, Cosio F, Demetris AJ, Drachenberg C, Einecke G, Gloor J, Glotz D, Kraus E, Legendre C, Liapis H, Mannon RB, Nankivell BJ, Nickleleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Rodriguez ER, Seron D, Seshan S, Suthanthiran M, Wasowska BA, Zachary A, Zeevi A. 2010. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant*, 10 (3):464-471.
- Soler-Garcia AA, Johnson D, Hathout Y, Ray PE. 2009. Iron-related proteins: candidate urine biomarkers in childhood HIV-associated renal diseases. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4 (4):763-771.
- Thongboonkerd V. 2008. Urinary proteomics: towards biomarker discovery, diagnostics and prognostics. *Mol Biosyst*, 4 (8):810-815.
- Thongboonkerd V, Malasit P. 2005. Renal and urinary proteomics: current applications and challenges. *Proteomics*, 5 (4):1033-1042.
- Thongboonkerd V, Chutipongtanate S, Kanlaya R. 2006. Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality, and variability. *J Proteome Res*, 5 (1):183-191.
- Van den Bergh G, Arckens L. 2005. Recent advances in 2D electrophoresis: an array of possibilities. *Expert Rev Proteomics*, 2 (2):243-252.
- Van Weemen BK, Schuurs AH. 1971. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett*, 15 (3):232-236.
- Wessel D, Flügge UI. 1984. A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute-Solution in the Presence of Detergents and Lipids. *Anal Biochem*, 138 (1):141-143.

- Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK. 1999. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*, 341 (23):1725-1730.
- Xu X, Fang Y, Ji J, Jiang S, Xing D, Fei S, Ding X. 2008. Clinical value of urinary kidney biomarkers for estimation of renal impairment in elderly Chinese with essential hypertension. *J Clin Lab Anal*, 22 (1):86-90.

Anhang

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. med. K. Junker sowie meine Betreuerinnen im Labor Frau Dipl.-Biol. Beatrice Stubendorff und Frau Dipl.-Biol. Martina Walther,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Frau Prof. Dr. med. Kerstin Junker für die Überlassung dieses Themas, die erstklassige Betreuung und die stets hilfreichen Ratschläge sowie für die Möglichkeit neben der Erarbeitung des Themas zahlreiche Erfahrungen auf verschiedenen Kongressen und Symposien zu sammeln.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Heiko Wunderlich meinen Dank für die klinische Betreuung und die fachlichen Erläuterungen aussprechen.

Frau Dr. med. Undine Ott und Herrn Dr. med. Torsten Gruschwitz danke ich sehr für die Hilfe bei der Auswahl der Patienten und die Möglichkeit für jegliche Rückfragen.

Außerdem möchte ich vor allem Frau Dipl.-Biol. Beatrice Stubendorff und Frau Dipl.-Biol. Martina Walther aufrichtig für ihre fachliche und freundschaftliche Unterstützung in der Zeit danken, sowie allen Mitarbeitern des Molekularbiologischen Forschungslabors der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena für die stets herzliche und freundliche Zusammenarbeit im Labor.

Zuletzt gilt mein uneingeschränkter Dank sowohl meinem Freund Martin für seine geduldige und liebevolle Unterstützung, als auch meinen Eltern für ihre bedingungslose Hilfe in allen Lebenslagen. Danke auch an meine Oma und meinen Bruder Steven, die immer eine Aufmunterung parat hatten und mir eine große moralische Stütze waren.

Diese Arbeit soll für meinen Opa sein, weil ich weiß, wie stolz er wäre.